

THESE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DU CENTRE INTERNATIONAL D'ETUDES SUPERIEURES EN SCIENCES
AGRONOMIQUES DE MONTPELLIER SUPAGRO

Ecole doctorale : Sciences des Procédés-Sciences des Aliments
Spécialité : Biotechnologie, Microbiologie

Présentée et soutenue publiquement par

Magalie CELTON

Le 21 octobre 2011

**Etude de la réponse de *Saccharomyces cerevisiae*
à une perturbation NADPH
par une approche de biologie des systèmes**

JURY

Bruno BLONDIN	Professeur, Montpellier SupAgro	Président
Jean-Marie FRANCOIS	Professeur, INSA Toulouse	Rapporteur
Jean-Pierre MAZAT	Professeur, CNRS, Université de Bordeaux 2	Rapporteur
Jean LABARRE	Directeur de recherche, DSV/iBiTec-S/SBIGeM CEA	Examineur
Sylvie DEQUIN	Directeur de recherche, INRA Montpellier	Co-directeur de thèse
Vincent FROMION	Directeur de recherche, INRA Jouy-en-Josas	Co-directeur de thèse

A mes parents,

Cette thèse a été réalisée grâce à un financement accordé par l'INRA dans le cadre d'un contrat ASC.

Les travaux ont été réalisés à l'INRA de Montpellier, à l'UMR Sciences pour l'œnologie dirigée par Jean Marie Sablayrolles. Ces travaux ont été effectués en collaboration avec l'équipe de Mathématiques Informatique et Génome à l'INRA de Jouy-en-Josas dirigé par Jean-François Gibrat. Je remercie Jean Marie Sablayrolles et par Jean-François Gibrat de m'avoir accueillie dans leur laboratoire.

Je tiens à remercier Sylvie Dequin pour son encadrement précieux. En gardant une vue d'ensemble sur le projet, elle a pu me guider dans le domaine pluridisciplinaire, nouveau et extrêmement intéressant de la biologie des systèmes. Je la remercie pour ses conseils et critiques pertinents et constructifs pour l'avancée de la thèse.

Je tiens à remercier également Vincent Fromion pour les longues heures de discussion scientifiques. Il m'a permis de ne pas avoir qu'une vision « biologique » de la levure et de son fonctionnement. Merci Vincent car je ne verrais plus jamais les histoires de plomberie et de tuyauries de la même façon.

Je remercie Jean-Marie François, Jean Labarre et Jean-Pierre Mazat d'avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse. Merci Bruno Blondin en tant que directeur de l'école doctorale et président de mon jury de thèse.

Je remercie tout particulièrement Carole Camarasa qui a toujours été là pour ses conseils scientifiques et ses encouragements. Merci d'avoir temporisé dans les moments difficiles et d'être à l'écoute c'était très agréable d'avoir été collègue de bureau.

Je tiens à remercier vivement Anne Goelzer pour sa patience, son efficacité et ses explications scientifiques. Anne c'était très agréable de travailler mais également de discuter avec toi.

Un grand merci aux permanents du laboratoire qui m'ont entourée tant au niveau techniques que moral. Et je m'excuse pour ma copine « acétoïne » qui laissait une « légère » petite odeur derrière moi !

Merci également à toutes les personnes des différents laboratoires que l'on croise dans les couloirs avec un grand bonjour et un sourire.

Un grand merci particulier à Marc Perez roi de la CPG et de l'HPLC !!

Et à « Monsieur » Picou qui a répondu à toutes mes questions sur la levure, la fermentation, les ordinateurs et bien plus encore....

Je remercie également tous les stagiaires et thésards que j'ai croisé durant ces années et qui mettent de la vie et de la bonne humeur dans le laboratoire.

Un grand merci aux filles d'à côté Tiphaine et Lucie pour les pauses détentes (quand la musique est bonne !!! ça fait toujours du bien) et les discussions que seul « veritas » connaît bien ! Merci Pooki d'avoir été là pour la partie la moins facile de la thèse et merci pour les dégustations plus ou moins ... « étrange » des mets de ton pays.

Un grand merci à toute ma famille et son soutien inconditionnel et même si je n'ai pas vu très souvent ma Bretagne elle a toujours une place dans mon cœur.

Un ENORME merci à tous mes amis et en particulier à mes amies Marie et Lucie, il est difficile d'écrire lorsqu'il ne suffirait pas d'une thèse pour décrire tout ce que vous m'apportez. Un ENORME merci à mes amis Loïc et Brice pour leurs discussions que ce soit au restaurant ou au téléphone qui ont à chaque fois été une bouffée d'air merci les mecs !!

SOMMAIRE

EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE

5

I- SACCHAROMYCES CEREVISIAE : UN MODELE POUR LA BIOLOGIE DES SYSTEMES	7
I-1 <i>S. cerevisiae</i> et les biotechnologies	7
I-2 <i>S. cerevisiae</i> : un organisme modèle	7
I-3 Le développement des approches de biologie des systèmes chez <i>S. cerevisiae</i>	9
I-4 Modélisation métabolique et analyse des flux chez <i>S. cerevisiae</i>	10
I-4.1 Principe de la modélisation stœchiométrique	11
I-4.2 Modèles stœchiométriques de la levure	12
I-4.3 Les contraintes stœchiométriques	13
I-4.4 Principe de l'approche de l'analyse métabolique des flux (MFA)	16
I-4.5 Analyse des flux métaboliques par marquage isotopique (^{13}C -MFA)	17
I-4.6 Approche Flux Balance Analysis (FBA)	20
II- METABOLISME ET EQUILIBRE REDOX EN FERMENTATION	24
II-1 <i>S. cerevisiae</i> : un métabolisme flexible	24
II-2 Cofacteurs et équilibres redox	25
II-3 Métabolisme du NAD(H)	29
II-3.1 Voies impliquées dans la synthèse du NADH	29
II-3.2 Réoxydation du NADH	29
II-3.3 Systèmes d'échange du NADH entre le cytoplasme et la mitochondrie	35
II-4 Métabolisme du NADP(H)	36
II-4.1 Synthèse du NADPH	37
II-4.2 Consommation du NADPH	49
II-4.3 Systèmes d'échange du NADPH entre le cytoplasme et la mitochondrie	53
II-5 Connections entre les couples NAD(H) et NADP(H)	53
II-5.1 Transhydrogénases chez différents organismes	54
II-5.2 NADH/NAD ⁺ kinases	54
II-5.3 Systèmes "transhydrogénase-like"	55
II-6 Perturbations de l'équilibre rédox et maintien de l'homéostasie	57
II-6.1 Perturbations du métabolisme NADH	59
II-6.2 Perturbations du métabolisme NADPH	61

MATERIELS ET METHODES

63

I-MATERIEL BIOLOGIQUE	65
I-1 Souches de levure	65
I-2 Plasmides	65
I-3 Oligonucléotides	65
II- MILIEUX ET CONDITIONS DE CULTURE	65
II-1 Composition des milieux de culture	65
II-2 Conditions de cultures	67
II-3 Mesure de la population cellulaire	69
II-3.1 Par la mesure de la densité optique	69

II-3.2 Par comptage cellulaire	69
II-3.3 Détermination de la matière sèche	69
II-4 Tests en "goutte"	69
III- TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE	70
III-1 Extraction d'ADN génomique	70
III-2 PCR : amplification de l'ADN	70
III-3 Electrophorèse en gel d'agarose	71
III-4 Transformation des levures	71
III-5 Méthode de "Short Flanking Homology PCR" (SFH-PCR)	72
III-6 Extraction des ARN totaux	72
III-7 Marquage des ADNc	73
III-8 Purification et dosage des sondes	74
III-9 Hybridation et détection	74
III-10 Traitement et analyse des données d'expression des gènes	75
IV- TECHNIQUES DE BIOCHIMIE	76
IV-1 Détermination d'activités enzymatiques	76
IV-1.1 Extraction des protéines totales de la levure	76
IV-1.2 Dosage des protéines	76
IV-1.3 Détermination <i>in vitro</i> de l'activité enzymatique de la butanediol déshydrogénase	76
IV-1.4 Calcul de l'activité spécifique des enzymes	77
IV-2 Détermination des composés de la biomasse	77
IV-2.1 Contenu en protéines	77
IV-2.2 Contenu en acides aminés	79
IV-2.3 Contenu en lipides	79
IV-2.4 Contenu en carbohydrates	80
IV-3- Extraction des métabolites intracellulaires	80
V- METHODES ANALYTIQUES	80
V-1 Dosage des métabolites extracellulaires par HPLC	80
V-2 Dosage de l'acétoïne et du 2,3-butanediol	81
V-3 Dosage des composés volatiles	83
VI- ANALYSE DES FLUX METABOLIQUES	84
VI-1 Marquage isotopique au ¹³ C des acides aminés protéinogéniques	84
VI-2 Détermination des flux intracellulaires	85
RESULTATS	90
<hr/>	
CHAPITRE I : DEVELOPPEMENT ET VALIDATION D'UN MODELE METABOLIQUE DE <i>S. CEREVISIAE</i> ADAPTE A L'ANALYSE DU METABOLISME REDOX EN CONDITIONS FERMENTAIRES	91

I- MODELE STOECHIMETRIQUE DE <i>S. CEREVISIAE</i> EN CONDITIONS FERMENTAIRES	95
I-1 Restreindre le modèle au réseau du métabolisme carboné central	95
I-2 Adaptation du réseau au métabolisme fermentaire	97
I-2.1 Choix des transporteurs extracellulaires en fermentation	97
I-2.2 Choix des réactions en fermentation	97
I-2.3 Choix des isoenzymes en fermentation	98
I-2.4 Le statut spécifique des déshydrogénases	101
I-3 Réactions de biosynthèse	101
I-3.1 Compartimentation des réactions de biosynthèse	101
I-3.2 Le statut spécifique du glutamate	105
I-3.3 Simplification par agrégation des réactions de biosynthèse	105
I-4 Echanges cytoplasme / mitochondrie	107
II- DYNAMOYEAST : UN OUTIL D'EXPLORATION DU METABOLISME	109
II-1 Structuration des informations	109
II-2 Calcul et prédiction des flux	109
II-3 Interface graphique de visualisation des flux	111
II-3.1 Information sur les réactions	111
II-3.2 Analyse systématique du réseau	111
II-4 Validation de l'implémentation informatique du modèle	115
III- VALIDATION EXPERIMENTALE DU SYSTEME	95
III-1 Validation par comparaison avec les phénotypes associés à des mutants de délétion	117
III-2 Validation à partir des données en conditions fermentaires	121
III-3 Comparaison avec les données produites à partir d'un modèle MFA	123
III-4 Validation sur une souche œnologique : EC1118 et comparaison avec les résultats de ¹³ C flux	123
IV- DETERMINATION DE LA CONSOMMATION DES COFACTEURS PAR LES VOIES DE SYNTHÈSE DE LA BIOMASSE	127
IV-1 Variabilité de la composition de la biomasse	127
IV-2 Analyse globale des bilans redox pour la formation des précurseurs de la biomasse	127
IV-3 Analyse de la production et de la consommation d'ATP	131
 CHAPITRE II : ANALYSE PAR UN MODELE A BASE DE CONTRAINTES DES CONSEQUENCES METABOLIQUES D'UNE AUGMENTATION DE L'OXYDATION DU NADPH CHEZ SACCHAROMYCES CEREVISIAE	 135
COMPLEMENT CHAPITRE II	177
Effet de l'acétoïne sur les 3 souches : essais préliminaires	177
MFA dynamique	177
Analyse des contraintes redox dans le cas d'une perturbation NADH	179
Analyse du métabolisme fermentaire de la souche 59A par une approche FBA	181

CHAPITRE III : ANALYSE COMPARATIVE TRANSCRIPTOMIQUE, METABOLOMIQUE ET FLUXOMIQUE DE LA REPONSE DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE A UNE AUGMENTATION DE L'OXYDATION DU NADPH	185
--	------------

<u>DISCUSSION GENERALE</u>	<u>223</u>
-----------------------------------	-------------------

<u>REFERENCES</u>	<u>237</u>
--------------------------	-------------------

Liste des figures

Figure 1 : Exemple d'un réseau stœchiométrique	14
Figure 2 : Démarche utilisée dans les expériences d'analyse de flux	18
Figure 3 : Vision synthétique du métabolisme fermentaire	22
Figure 4 : Formation d'acétoïne et de 2,3 butanediol	30
Figure 5 : Voie Ehrlich : catabolisme des acides aminés impliqués	32
Figure 6 : Navette acétaldehyde-éthanol	34
Figure 7 : Navettes malate/aspartate (A) et malate/oxaloacétate (B)	34
Figure 8 Voie des pentoses phosphates (VPP)	38
Figure 10 : Utilisation des cofacteurs pour la synthèse de la biomasse	46
Figure 12 : Voie d'assimilation des sulfates et voie de synthèse de la méthionine	50
Figure 13: Mécanismes de réponse au stress oxydatif et rôle du NADPH dans la régénération des formes réduites du glutathion et de la thiorédoxine.	52
Figure 14 : Transporteur YHM2, permettant d'échanger le NADPH mitochondrial et cytosolique	52
Figure 15 : Couplage entre l'enzyme malique et la malate déshydrogénase	58
Figure 16 : Couplage du cycle glycérol-DHA	58
Figure 17 : Couplage des glutamates déshydrogénases (Gdh1p, Gdh3p, Gdh2p)	60
Figure 18 : Structure du modèle	108
Figure 19 : Interface graphique du réseau stœchiométrique du métabolisme carboné central de la levure <i>S. cerevisiae</i>	110
Figure 20 : Présentation de la description de chaque réaction à partir de l'interface graphique de <i>DynamoYeast</i>	112
Figure 21 : Affichage des informations sur les régulations pour une réaction donnée	113
Figure 22 : Réactions enzymatiques activées (rouge) et réprimées (vert) par le facteur de transcription Stb5p	114
Figure 23 : Distribution des flux de la levure œnologique EC1118 en condition de fermentation	116
Figure 24 : Validation de la conservation de la masse au niveau du nœud métabolique G6P	118
Figure 25: Prédiction du modèle à partir de données expérimentales extraites de la littérature (Albers et al., 1996)	120
Figure 26 : Distribution des flux prédits par <i>DynamoYeast</i> dans le métabolisme carboné central à partir des données de métabolites extracellulaires produites par Albers et al. (1996)	122
Figure 27 : Comparaison entre la distribution des flux basés sur l'approche MFA de Nissen et al. (1997) et les données prédites par le modèle <i>DynamoYeast</i> en conditions d'anérobioses où le glucose est limité	124
Figure 28: Comparaison entre les données expérimentales de ¹³ C flux de la souche œnologique EC1118 (Cadière et al., 2011) et les données prédites par le modèle <i>DynamoYeast</i>	126
Figure 29: Quantités de NADH produits et NADPH et ATP (+) consommés (-) lors de la synthèse des composés de la biomasse	128
Figure 30: Quantité de NADPH consommé (A) et de NADH produit (B) par les réactions de synthèse des principaux composants de la biomasse (acides aminés, carbohydrates, ARN, ADN et lipides) pour la souche Bdh-NADPH	129
Figure 31 : Consommation relative de NADPH par les acides aminés	130
Figure 32 : Répartition de la quantité d'ATP consommée par les réactions de synthèse des principaux composants de la biomasse (acides aminés, carbohydrates, ARN, ADN)	130

Figure 33 : Quantité de NADH ou de NADPH consommé et produit par la souche Bdh-NADPH sans acétoïne au cours de la fermentation.	178
Figure 34 : Quantité de NADH (A) ou de NADPH (B) consommé et produit par la souche Bdh-NADPH en présence de 300 mM d'acétoïne au cours de la fermentation.	178
Figure 35 Réponse métabolique de la levure à une augmentation de la demande en NADH.	180
Figure MM 1 : Programme de température de la GC/MS pour le dosage de l'acétoïne et du 2,3-butanediol	82
Figure MM 2 : Programme de température du four de la GC utilisé pour le dosage des volatiles	82
Figure MM 3 : Paramètres de la GC/MS pour le dosage des acides aminés et du glucose marqués	86

Liste des tableaux

Tableau 1 : Exemple de bases de données regroupant des informations sur <i>S. cerevisiae</i>	8
Tableau 2 : Comparaison de la composition des modèles métaboliques à l'échelle du génome de <i>S. cerevisiae</i>	14
Tableau 3 : Potentiel standard des réactions d'oxydo-réduction à pH 7.0 à 25°C	26
Tableau 4 : Métabolites les plus connectés du réseau stœchiométrique de <i>S. cerevisiae</i> (Nielsen, 2003)	26
Tableau 5 : Equations bilan de synthèse des différents sous produits impliquant la production ou la réoxydation du NADH	28
Tableau 6 : Systèmes d'échange du NAD(H) entre le cytosol et la mitochondrie	32
Tableau 7 : Principaux facteurs de transcription qui régulent les gènes de la VPP	40
Tableau 8 : Contribution de la VPP à la production de NADPH	42
Tableau 9 : Systèmes d'échange entre les cofacteurs NADP(H) et NAD(H) chez <i>S. cerevisiae</i>	43
Tableau 10 : Répartition de la composition de biomasse de la souche	96
Tableau 11 : Liste des déshydrogénases incluses dans le modèle	100
Tableau 12 : Localisation des réactions impliquées dans la synthèse des acides aminés	102
Tableau 13 : Réactions de synthèse agrégées de la biomasse	104
Tableau 14 : Transporteurs mitochondriaux intégrés dans le modèle	106
Tableau 15 : Description de chaque entité du modèle	108
Tableau 16 : Table de vérité de la létalité d'une souche pour une réaction entre les données expérimentales et les prédictions du modèle	118
Tableau 17 : Comparaison entre les données prédites par <i>DynamoYeast</i> et les données <i>in vivo</i> des phénotypes des mutants du métabolisme carboné central en conditions fermentaires	119
Tableau 18 : Variabilité de la composition de la biomasse	128
Tableau MM 1 : Liste des plasmides utilisés	66
Tableau MM 2 : Liste des souches utilisées et issues de ce travail	66
Tableau MM 3 : Milieux utilisés dans l'étude	68
Tableau MM 4 : Solution mère des facteurs anaérobies	68
Tableau MM 5 : Mélange réactionnel pour le dosage de l'activité enzymatique de l'enzyme BDH	78

Publications

Celton M., Goelzer A., Camarasa C., Fromion V. and Dequin S., A system biology analysis of the metabolic consequences of increased NADPH oxidation in *Saccharomyces cerevisiae*. Submitted to *Metabolic engineering*.

Celton M., Sanchez I., Goelzer A., Camarasa C., Fromion V. and Dequin S., A comparative transcriptomic, fluxomic and metabolomic analysis of the response of *Saccharomyces cerevisiae* to increased NADPH oxidation. Submitted to *BMC Genomics*.

Communications orales

Celton M., Fromion V., Goelzer A., Camarasa C., and Dequin S. Etude de la réponse de *S. cerevisiae* à une perturbation du NADPH par une approche de biologie des systèmes. Journée de l'école doctorale Sciences des procédés-Sciences des aliments (Montpellier, France, June 22 2010).

Celton M., Fromion V., Goelzer A., Camarasa C., and Dequin S. A system biology study of the response of *S. cerevisiae* to a NADPH perturbation. Journées des microbiologistes de l'INRA (Poitiers, France May 5nd-7th 2010).

Celton M., Fromion V., Goelzer A., Camarasa C., and Dequin S. A system biology approach of NADPH metabolism in *S. cerevisiae*. International Course in Yeast System Biology (Göteborg, Sweden, June 2nd-19th 2008).

Posters

Celton M., Fromion V., Goelzer A., Camarasa C., and Dequin S. A system biology of the response of *S. cerevisiae* to NADPH perturbation. 4th Conference on Physiology of Yeast and Filamentous Fungi (PYFFIV) (Rotterdam, the Netherlands, June 1st-4th 2010).

Celton M., Fromion V., Goelzer A., Camarasa C., and Dequin S. A system biology approach of NADPH metabolism in *S. cerevisiae*. 24th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology (Manchester, England, July 19nd-24th 2009).

Celton M., Fromion V., Goelzer A., Camarasa C., and Dequin S. Etude du métabolisme du NADPH à une perturbation par une approche de biologie des systèmes chez *S. cerevisiae*. Journée de l'école doctorale Sciences des procédés, Sciences des aliments (Montpellier, France, June 18 2009).

Celton M., Fromion V., Goelzer A., Camarasa C., and Dequin S. Etude du métabolisme du NADPH par une approche de biologie des systèmes chez *S. cerevisiae*. Levures modèles et outils VIII (LMO8) (La Colle sur Loup, France, October 26nd-29th 2008).

Liste des symboles et des abréviations

%	Pourcentage
ΔE_0	Différence de potentiel
ΔG	Valeur de Gibbs
α	Alpha
β	Bêta
V	Flux métabolique
°C	Degré Celcius
μmol	Micromole
^{13}C	Carbone 13
ADN	Adénosine diphosphate
ADNc	Adénosine diphosphate complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARN messagers	Acide ribonucléique messenger
AV	Activité volumétrique
BCA	Acide bicinchoninique
BET	Bromure d'éthidium
BSA	Bovine serum albumin
ChIP-chip	Chromatin immunoprecipitation on Chip
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
Cy3-dUTP; Cy5-dUTP	Fluorophores Cy3 et Cy5
D	Taux de dilution
DEPC	Diéthylpyrocarbonate
dm/dt	Vecteur d'accumulation des métabolites
DMF/DMA	Diméthylformamide-diméthyl-acétate
dNTPs	Désoxyribonucléotides triphosphate
DTT	Dithiothreitol
ECF-TFAA	Ethylchloroformate/trifluoroacetic anhydre
EDTA	Acide éthylène diamine tétracétique
eV	Electronvolt
FBA	Flux balance analysis
FDR	False discovery rate
FID	Détecteur à ionisation de flamme
FOI	Fréquence d'incorporation des fluorochromes
g/L; mg/L	Gramme par litre; milligramme par litre
GC	Chromatographie en phase gazeuse
GC-MS	Spectrométrie de masse couplé à la chromatographie en phase gazeuse
gDW	G de poids secs (g Dry Weight)
GFP	Green fluorescent protein
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
H ₂ S	Sulfure d'hydrogène
HMF	5-hydroxyméthylfurfural
HOG MAPK	High osmolarity glycerol MAP Kinase

HPLC	Chromatographie haute pression en phase liquide
IAA	Alcool isoamylique
IDMS	Dilution isotopique pour la spectrométrie de masse
KEGG	Kyoto encyclopedia of Genes and Genomes
kV	Kilovolt
LC	Chromatographie en phase liquide
LiAc	Lithium d'acétate
LP	Programmation linéaire
MCC	Métabolisme carboné central
MFA	Metabolic flux analysis
min	Minutes
mm	Millimètre
MRM	Multiple reaction monitoring
ng	Nanogramme
ORF	Open reading frame
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyéthylène glycol
pmol	Picomole
PntAB, Sth	Transhydrogénases
PRPP	5-phosphoribosyl-1-PP
Q_{lip}	Quantité de lipide
Q_{MS}	Poids sec
Q_{prot}	Quantité de protéine
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RNase	Ribonucléase
ROS	Reactive oxygen species
Rp1p	D-ribulose-5-phosphate 3-épimérase
S	Matrice stœchiométrique
SBML	Systems biology markup language
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SFL	Summed fractional labeling
SGD	Saccharomyces genome database
TCA	Cycle des acides tricarboxyliques
$U\text{-}^{13}\text{C}$	Carbones uniformément marqués du glucose
v/v	Rapport volume à volume
VPP	Voie des pentoses phosphate
YeastRACT	Yeast search for transcriptional regulators
YEPD	Yeast extract peptone dextrose
YNB	Yeast nitrogen base

Liste des métabolites

1.6FDP	1,6 fructose biphosphate
ADP	Adénosine diphosphate
ATP	Adénosine triphosphate
2,3BUTA	2,3 butanediol
2PG	2-phosphoglycerate
PAPS	3-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate
13PDG	3-phospho-D-glyceroyl-phosphate
3PG	3-phosphoglycerate
6PGL	6-phospho glucolactone
6PG	6-phosphogluconate
ACAL	Acétaldéhyde
ACET	Acétate
ACTO	Acétoïne
ACCOA	Acetyl-coa
AKG	A-cétoglutarate
CIT	Citrate
DHA	Dihydroxyacetone
DHAP	Dihydroxyacetone phosphate
CO2	Dioxyde de carbone
E4P	Erythrose-4-phosphate
ETOH	Ethanol
FAD ⁺	Flavine adénine dinucléotide, forme oxydée
FADH2	Flavine adénine dinucléotide, forme réduite
FRUC	Fructose
F6P	Fructose-6-phosphate
FUM	Fumarate
GLU	Glucose
G6P	Glucose-6-phosphate
GLU	Glutamate
GLN	Glutamine
GSH	Glutathion
G3P	Glycéraldéhyde-3-phosphate
GL	Glycérol
GL3P	Glycérol-3-phosphate
H ⁺	Hydrogène
ICIT	Isocitrate
MAL	Malate
NADP ⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme oxydée
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme réduite
NAD ⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide, forme oxydée
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide, forme réduite

OAA	Oxaloacétate
O2	Oxygène
Pi	Phosphate
PEP	Phosphoenolpyruvate
PYR	Pyruvate
R5P	Ribose-5-phosphate
RL5P	Ribulose-5-phosphate
S7P	Sedoheptulose-7-phosphate
SUCC	Succinate
SUCCOA	Succinyl-coa
TRX	Thioredoxine
X5P	Xylose-5-phosphate

Liste des gènes et des enzymes

Gènes	Abbreviations enzymes	Enzymes
<i>ACO1, ACO2</i>	Acop	aconitase hydratase
<i>ACS1</i>	Acs1p	acétyl-CoA synthase
<i>ADH1, ADH2, ADH3, ADH4, ADH5, ADH6, ADH7</i>	Adhp ou ADH	alcool déshydrogénase
<i>ALD2, ALD3, ALD4, ALD5, ALD6</i>	Aldp ou ALD	acétaldéhyde déshydrogénase
<i>ARA1, GCY1, YPR1, GRE3</i>	Ara1p, Gcy1p, Ypr1p, Gre3p	glycérol déshydrogénase
<i>BDH1</i>	Bdhp ou BDH	butanediol déshydrogénase
<i>CDC19, PYK2</i>	Cdc19p, Pyk2p	pyruvate kinase
<i>CIT1, CIT3</i>	Citp	citrate synthase
<i>ENO1, ENO2</i>	Enop	énolase
<i>FBA1</i>	Fba1p	aldolase
<i>FRDS1, OSM1</i>	Frds1p, Osm1p	fumarate réductase
<i>FUM1</i>	Fum1p	fumarase
<i>GDH1, GDH2, GDH3</i>	Gdhp ou GDH	glutamate déshydrogénase
<i>GLN1</i>	Gln1p ou GS	glutamine synthétase
<i>GLT1</i>	Glt1p ou GOGAT	glutamate synthase
<i>GND1, GND2</i>	Gndp	6-phosphogluconolactonase
<i>GPD1, GPD2</i>	Gpdp ou GPDH	glycérol-3-phosphate déshydrogénase
<i>GPM1, GPM2</i>	Gpmp	phosphoglycérate mutase
<i>GPP1, GPP2</i>	Gppp	glycérol-3-phosphatase
<i>HXK1, HXK2</i>	Hxkp	hexokinase
<i>IDP1, IDP2, IDP3, IDH1, IDH2</i>	Idpp, Idhp	isocitrate déshydrogénase
<i>ILV2, ILV6</i>	Alsp	2-acetolactate synthase
<i>KGD1, KGD2, LPD1</i>	Akgp	complexe alpha-cétoglutarate déshydrogénase
<i>LSC1, LSC2</i>	Lscp	succinyl-CoA ligase
<i>MAE1</i>	Mae1p	Malic enzyme
<i>MDH1, MDH2</i>	Mdhp	malate déshydrogénase
<i>PDA1, PDB1, LAT1, LPD1, PDX1</i>	Pdhp	complexe pyruvate dehydrogenase
<i>PDC1, PDC5</i>	Pdcp	pyruvate décarboxylase
<i>PFK1, PFK2</i>	Pfkp	Phosphofructokinase
<i>PGI1</i>	Pgi1p	glucose-6-phosphate isomérase
<i>PGK1</i>	Pgk1p	3-phosphoglycérate kinase

<i>PYC1, PYC2</i>	Pycp	pyruvate carboxylase
<i>RKI1</i>	Rki1p	ribose-5-phosphate-ketol- isomérase
<i>RPE1</i>	Rpe1p	ribulose-phosphate 3 épimérase
<i>SDH1, SDH2, SDH3, SDH4</i>	Sdhp	succinate déshydrogénase
<i>SOL3, SOL4</i> <i>TAL1</i>	Solp Tal1p	6-phosphogluconolactonase transaldolase
<i>TDH1, TDH2, TDH3</i>	Tdhp	glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
<i>TKL1, TKL2</i>	Tklp	transcétolase
<i>TPI1</i>	Tpi1p	triosephosphate isomérase
<i>UTR1, YEF1, POS5</i>	Utr1p, Yef1p, Pos5p	NADH kinase
<i>ZWF1</i>	Zwf1p	glucose-6-phosphate déshydrogénase

INTRODUCTION

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est un organisme modèle pour l'étude des processus cellulaires, et le premier eucaryote dont le génome a été complètement séquencé (Goffeau et al., 1996). La connaissance de son génome et les avancées en biologie et bioinformatique ont facilité le développement d'outils de génomique fonctionnelle permettant d'étudier et de quantifier le comportement cellulaire. Ainsi, de nombreux outils permettant l'analyse du transcriptome, du protéome, du métabolome, des flux ou de l'interactome ont été développés depuis la fin des années 90. La disponibilité de ces outils a généré une masse importante de données biologiques, collectées dans différentes bases de données dont SGD (*Saccharomyces* genome database). Du fait du niveau élevé de connaissances atteint chez cet organisme, *S. cerevisiae* est devenue il y a une dizaine d'année l'un des premiers organismes modèle pour la biologie des systèmes (Mustacchi et al., 2006), une discipline dont l'objectif est d'obtenir une description quantitative des processus cellulaires et de prédire le fonctionnement de la cellule.

La levure *S. cerevisiae* est également un des microorganismes les plus utilisés dans le domaine des biotechnologies. Utilisée par l'homme depuis des millénaires pour des applications traditionnelles telles que la production de vin, de bière et de pain, cette levure est aussi largement utilisée comme "usine cellulaire" pour différentes applications, comme la production de protéines recombinantes d'intérêt pharmaceutique, de divers produits chimiques et plus récemment pour la production de bioéthanol. Le marché des produits dérivés des fermentations est aujourd'hui en pleine expansion.

En lien avec l'importance de ce microorganisme dans les biotechnologies, de nombreux travaux ont été conduits pour optimiser les propriétés des souches. Dès les années 90, l'essor de la génomique et de la post génomique a facilité le développement des approches d'ingénierie métabolique. Ces approches, qui reposent sur l'utilisation des techniques de génie génétique pour modifier des voies métaboliques existantes ou introduire de nouvelles voies, ont depuis été largement appliquées à *S. cerevisiae* pour la synthèse de nouveaux produits ou l'amélioration du rendement ou de la productivité de métabolites clés.

De nombreuses propriétés d'intérêt technologique (performances fermentaires, rendements des métabolites) sont liées au métabolisme carboné central (MCC). Ce sous-ensemble du métabolisme comprenant la glycolyse, la voie éthanol, le cycle tricarboxylique ou TCA et la voie des pentoses phosphates (VPP) a été largement étudié chez la levure, et l'on dispose de nombreuses connaissances sur les voies et enzymes mises en jeu, la

compartimentation ainsi que les grandes règles de régulation. La connaissance du fonctionnement du métabolisme reste cependant limitée du fait de la complexité du réseau, qui est composé de nombreuses voies non linéaires, fortement interconnectées, reliées par des métabolites et cofacteurs communs, ainsi que par la superposition de différents niveaux de régulation (génétique/métabolique) qui contrôlent son fonctionnement.

Améliorer les propriétés des souches en réorientant le métabolisme nécessite donc une bonne connaissance du fonctionnement du réseau et de sa régulation, afin de mettre en œuvre des stratégies rationnelles permettant de rediriger les flux vers un ou des produits d'intérêt tout en minimisant les effets secondaires. Les approches de biologie des systèmes développées depuis ces dix dernières années ont été appliquées à l'étude du métabolisme, avec l'objectif d'obtenir une vision globale du fonctionnement du réseau. Ces approches reposent généralement sur l'utilisation de modèles mathématiques et d'approches expérimentales globales ("omiques") permettant d'obtenir une description quantitative du fonctionnement de la cellule. L'intérêt de ces modèles est à la fois explicatif – extraire l'information de données globales, et prédictif – aide à la définition d'approches d'ingénierie. Chez la levure, plusieurs modèles décrivant le réseau métabolique ont été développés. Différentes méthodes, combinant données expérimentales et les contraintes du réseau stœchiométrique, telles que l'approche MFA ("Metabolic Flux Analysis"), ^{13}C -flux et les FBA ("Flux Balance Analysis") permettent de prédire avec plus ou moins de fiabilité la distribution des flux du réseau métabolique

L'objectif de cette thèse est d'améliorer notre compréhension du fonctionnement du métabolisme redox chez la levure en utilisant une approche de biologie des systèmes. Les principaux couples redox NADP(H) et NAD(H) participent à un nombre de réactions élevé (~ 200 réactions). L'ingénierie du métabolisme redox s'est révélée, ces dernières années, une approche attractive pour rediriger les flux métaboliques vers des sous-produits d'intérêt. Par exemple, plusieurs travaux ont été développés afin de maximiser ou, au contraire minimiser le rendement en éthanol. En œnologie, différentes stratégies ont été mises en œuvre afin de diminuer le rendement en éthanol, reposant sur l'ingénierie du métabolisme NADH (Heux et al., 2006; Remize et al., 1999; Ehsani et al., 2009), ou de la voie des pentoses phosphates (VPP), principale voie de production du NADPH (Cadiere et al., 2011). Dans le domaine du bioéthanol, un des problèmes majeurs dans la construction de souches utilisant du xylose est le déséquilibre redox engendré. Parmi les approches visant à augmenter la productivité en

éthanol, nous pouvons citer l'expression de transhydrogénases ou l'augmentation du flux à travers la VPP (Jeun et al., 2003; Jeffries and Yin, 2003; Nissen et al., 2000; Bro et al., 2006).

L'étude du métabolisme redox a fait l'objet de plusieurs études récentes. Plus particulièrement, la réponse de la levure à une perturbation du ratio NADH/NAD⁺ ou à un échange des cofacteurs NAD(H) et NADP(H), obtenu par expression de transhydrogénases, a été étudiée (Hou et al., 2009; Hou et al., 2010; Vemuri et al., 2007; Heux et al., 2006). Par contre, le métabolisme du NADPH a reçu moins d'attention. Ce cofacteur intervient dans 79 réactions (Nielsen, 2003), en particulier dans les réactions anaboliques (synthèse de la biomasse) et dans les mécanismes de protection contre le stress oxydatif. Il est principalement produit dans le cytosol par la voie des pentoses phosphates (VPP) et la voie acétate et dans la mitochondrie par l'enzyme malique (Mae1p) et l'isocitrate déshydrogénase (Idp1p). Alors que les voies mises en jeu sont bien identifiées, leur contribution relative est peu connue, en particulier en fonction de différents niveaux de demande. D'autre part, la part des régulations métaboliques ou génétiques reste mal connue. Récemment un facteur de transcription Stb5p activant de manière coordonnée des gènes impliqués dans le métabolisme du NADPH en conditions de stress oxydatif a été identifié, posant la question du rôle de ce régulateur pour ajuster la réponse de la cellule à la demande NADPH.

Ce projet de thèse s'inscrit dans le cadre de l'amélioration des connaissances et de maîtrise du métabolisme redox. Nous avons, au cours de cette thèse, étudié la réponse de la levure à une perturbation ciblée et graduelle du métabolisme NADPH, avec pour objectif de déterminer la contribution des voies de production du NADPH au maintien de l'homéostasie du NADPH pour différents niveaux de perturbation et la part de la régulation génétique et métabolique dans l'ajustement de la demande NADPH. Nous avons pour cela opté pour une démarche itérative de biologie des systèmes, combinant des analyses globales "omiques" et de la modélisation. Les différentes étapes ont consisté (i) à mettre en place un système biologique permettant d'imposer à la levure une consommation spécifique, et à différents niveaux du NADPH et à quantifier cette consommation (ii) à développer un modèle stœchiométrique du métabolisme primaire en fermentation (iii) à analyser de façon quantitative la réponse à la perturbation à l'aide du modèle et en combinant analyses ¹³C flux, analyse des métabolites intra et extracellulaires et analyse transcriptomique.

Cette approche devait nous permettre d'obtenir une description quantitative et globale du fonctionnement du métabolisme NADPH, reposant sur une analyse de la distribution des

flux intracellulaires et de différents niveaux de régulation. Un autre objectif important de cette thèse était d'évaluer la faisabilité et l'intérêt d'une approche de biologie des systèmes pour augmenter notre connaissance du métabolisme. Cette démarche étant récente et relativement lourde à mettre en place car nécessitant l'acquisition de compétences pluridisciplinaires, *i.e* en modélisation et en biologie, il nous a paru important d'essayer de répondre à des questions bien ciblées, telles que celles décrites ci-dessus.

EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE

I- *Saccharomyces cerevisiae* : un modèle pour la biologie des systèmes

I-1 *S. cerevisiae* et les biotechnologies

La levure *Saccharomyces cerevisiae* occupe une place privilégiée dans les activités industrielles. Elle est utilisée par l'homme depuis des millénaires pour la production de boissons et produits fermentés (vin, bière, pain) et joue un rôle très important dans l'industrie agroalimentaire comme agent de fermentation et pour l'élaboration de produits dérivés. De nos jours, la levure est également largement utilisée comme usine cellulaire pour la production de molécules d'intérêt. Dans le domaine pharmaceutique et médical, elle est utilisée pour la production de vaccins, de probiotiques ou de protéines comme l'insuline (Roberts and Oliver, 2010). Elle joue également un rôle clé dans l'industrie chimique pour la synthèse de produits de commodité comme l'acide lactique pour la production des plastiques et dans le domaine des énergies renouvelables et des biocarburants (bioéthanol). Le secteur des biotechnologies blanches présente aujourd'hui un très fort potentiel de croissance.

I-2 *S. cerevisiae* : un organisme modèle

S. cerevisiae est depuis longtemps un organisme de choix pour l'étude des mécanismes cellulaires eucaryotes (réplication, recombinaison, transcription) et pour l'étude du métabolisme (identification des voies, enzymes impliquées).

La levure est le premier organisme eucaryote dont le génome (environ 6000 gènes) a été complètement séquencé (Goffeau et al., 1996). Depuis, de très nombreux outils de post-génomique ont été développés chez cette espèce afin de décrire de façon systématique les différents agents impliqués dans l'activité cellulaire et de faciliter l'analyse fonctionnelle du génome. La transcriptomique permet de quantifier le niveau d'expression de l'ensemble des gènes de la levure. Les contenus en protéines et en petites molécules (intermédiaires métaboliques) sont analysés respectivement par des techniques de protéomique et de métabolomique. L'interactome étudie le réseau d'interactions entre protéines chez un organisme.

Bases de données	Abbreviations	Sites	Domaine
Saccharomyces Genome Database	SGD	www.yeastgenome.org/	Dédiée à la levure
Stanford MicroArray Database		genome-www5.stanford.edu/	Transcriptome
Yeast deletion project		www-sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project/data_sets.html	Mutants de délétion
MIPS comprehensive yeast genome database	MIPS	mips.gsf.de/genre/proj/yeast/	Génome, protéome, réseaux métaboliques
Comprehensive systems biology database	CSB	csbdb.mpimp-golm.mpg.de/	Transcriptome, métabolome, réactions métaboliques
General repository for interaction datasets	Biogrid	www.thebiogrid.org/	Interactions génomiques et protéomiques
Yeast search for transcriptional regulators and consensus tracking	Yeasttract	www.yeasttract.com/	Données de régulations génétiques
Cold Spring Harbor Laboratory	Reactome	www.reactome.org/	Réactome, réseaux métaboliques
Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes	KEGG	www.genome.jp/kegg/	Réseaux métaboliques
BRAunschweig ENzyme Database	BRENDA	www.brenda-enzymes.info/	Enzymes

Tableau 1 : Exemple de bases de données regroupant des informations sur *S. cerevisiae*

Les méthodologies d'analyse de flux, ou fluxomique, permettent d'accéder à la distribution du flux (en général carboné) au travers le réseau métabolique actif d'un organisme. En dernier lieu, certains paramètres cellulaires fonctionnels tels que le pH intracellulaire et les potentiels transmembranaires peuvent être mesurés grâce aux techniques d'imagerie et de cytométrie de flux.

Une nouvelle révolution technologique a vu le jour au début du 21^{ème} siècle, avec le développement remarquable des méthodes de séquençage massif et la forte diminution des coûts associés. Ces avancées ont conduit très récemment au reséquençage de très nombreux génomes *S. cerevisiae*.

I-3 Le développement des approches de biologie des systèmes chez *S. cerevisiae*

L'utilisation des outils de post-génomique à haut-débit chez *S. cerevisiae*, a considérablement accru le niveau de connaissances de cet organisme. Toutefois, cela a également généré une quantité massive de données hétérogènes, difficiles à interpréter de façon isolée et un enjeu majeur est alors d'analyser de façon intégrée l'ensemble de ces informations pour comprendre le fonctionnement global de la levure. A l'heure actuelle, des plateformes de biologie intégrative, développées par des bio-informaticiens, compilent un grand nombre de ces informations (**Tableau 1**), comme la base de donnée *Saccharomyces* Genome Database (SGD), qui repertorie une grande part des connaissances sur la levure (Cherry et al., 1997; Engel et al., 2010). Cependant, le regroupement des données issues de la post-génomique dans des bases de données, même très exhaustives, ne donne qu'une image des différents composants élémentaires de la cellule, sans prendre en compte leurs réels rôles dans la réalisation des processus élémentaires de la cellule. En conséquence, cette approche descriptive ne permet pas de comprendre les mécanismes biologiques impliqués dans l'activité cellulaire. Dans le cadre de l'analyse des réseaux d'interactions complexes, il est donc nécessaire de prendre en compte les réseaux dynamiques et les modules liant gènes, protéines, métabolites etc. Pour cela, une nouvelle démarche a été adoptée, la biologie des systèmes ou biologie intégrative, qui s'appuie sur des concepts de mathématiques appliquées (modélisation et analyse des systèmes dynamiques) pour modéliser les réseaux d'interactions entre les différents composants élémentaires de l'organisme. Ainsi, la biologie des systèmes vise à intégrer les différents niveaux de description de l'organisme et les interactions entre ces

différents éléments pour comprendre le fonctionnement cellulaire dans sa globalité. Cette méthodologie requiert donc la combinaison d'approches expérimentales (production de données), informatiques (organisation des données) et théoriques (mathématiques) pour modéliser le système.

Il s'agit dans un premier temps, de formuler des hypothèses sur le fonctionnement de l'organisme étudié à partir de connaissances scientifiques disponibles (données expérimentales obtenues à partir de l'organisme étudié, à un ou plusieurs niveaux de la hiérarchie cellulaire) intégrées dans un modèle mathématique.

Dans un deuxième temps, la réponse du système à des perturbations environnementales ou génétiques est analysée, à la fois au niveau expérimental et à partir du modèle mathématique (prédiction). Une divergence entre les deux réponses conduira à modifier les hypothèses ayant servi de base à la modélisation, et plus souvent à affiner et modifier le modèle mathématique. Cette démarche est par nature itérative, et sera répétée autant que nécessaire jusqu'à ce qu'on soit arrivé à répondre de façon satisfaisant à la question d'intérêt. Ainsi, la biologie des systèmes devrait permettre de comprendre comment les différentes parties d'un organisme fonctionnent et interagissent entre elles.

Ces 15 dernières années, différents modèles ont été développés afin de mettre en place une approche de biologie des systèmes pour comprendre le fonctionnement de *S. cerevisiae*, et notamment le contrôle de son cycle cellulaire (Battogtokh and Tyson, 2004) et de son métabolisme. Au regard de notre question, nous nous sommes focalisé sur les modèles se rapportant au métabolisme.

I-4 Modélisation métabolique et analyse des flux chez *S. cerevisiae*

Le réseau métabolique est constitué d'un ensemble de réactions chimiques catalysées par des enzymes permettant de transporter les nutriments présents dans le milieu extracellulaire et de les transformer en composants élémentaires (par exemple les acides aminés) utilisés dans la synthèse des macromolécules (par exemple les protéines).

Les réactions composant le réseau métabolique sont fortement interconnectées à travers l'utilisation de cofacteurs ou d'intermédiaires métaboliques communs.

En outre, une même enzyme peut catalyser différentes réactions chimiques. A l'inverse, il peut exister plusieurs enzymes différentes catalysant la même réaction chimique qui sont des isoenzymes. Le flux métabolique d'une réaction correspond à la vitesse de synthèse du (des) produit(s) de la réaction par l'enzyme. Ainsi le flux métabolique associé à une enzyme (et donc à une réaction chimique) dépend de la concentration de l'enzyme, de ses propriétés cinétiques intrinsèques et des concentrations des substrats, des produits et de tout métabolite ou ion pouvant jouer un rôle régulateur. Différents niveaux de contrôle peuvent moduler la vitesse des réactions chimiques, par exemple le flux métabolique, grâce à des mécanismes variés comme par exemple :

- la régulation transcriptionnelle et/ou traductionnelle, la dégradation des ARN messagers agissant au niveau génétique sur la concentration intracellulaire de l'enzyme ;
- le contrôle post-traductionnel et la régulation allostérique modulant directement l'activité de l'enzyme.

Dans ce contexte, afin d'accéder à une meilleure compréhension du métabolisme et de sa régulation, une approche de modélisation a été développée. Les avancées que peut apporter cette approche dans l'étude du fonctionnement du métabolisme résident tout d'abord dans le fait que c'est une approche intégrative à l'échelle de la cellule, ce qui permet de prendre en compte l'ensemble des interactions entre les différents composants du système (métabolites, enzymes,...). D'autre part, cette méthodologie donne accès à la distribution quantitative des flux au travers du réseau métabolique de la cellule, qui donne une image du fonctionnement de la cellule proche du phénotype et qui peut prendre en compte les régulations amont (expression génique, traduction, modifications post traductionnelles, régulations par les métabolites).

I-4.1 Principe de la modélisation stœchiométrique

Il existe de nombreux modèles mathématiques décrivant le métabolisme de la levure, qui peuvent être différenciés en modèles stœchiométriques, qui décrivent le réseau

métabolique actif de la cellule dans un état stable, et en modèles cinétiques qui décrivent de façon très détaillée les propriétés cinétiques spécifiques à chaque composant du système. L'inconvénient majeur de ces derniers modèles est qu'ils nécessitent une connaissance approfondie et un grand nombre de données biologiques. Par conséquent, ils ont été utilisés pour décrire des parties bien caractérisées biologiquement du réseau métabolique comme la glycolyse ou la VPP (Vaseghi et al., 1999), sans considérer le réseau métabolique dans son ensemble.

A l'inverse, les modèles stœchiométriques ne nécessitent aucun paramètre. Seules sont requises (i) l'identification de l'ensemble des réactions chimiques ainsi que les enzymes/gènes associé(e)s ; (ii) la stœchiométrie associée à chaque réaction chimique. Le réseau métabolique est représenté sous forme matricielle par une matrice dite de stœchiométrie que nous détaillons dans le paragraphe §I.4.3. Chaque colonne décrit la stœchiométrie associée à une réaction chimique (et donc à un flux métabolique). Chaque ligne correspond à un métabolite et décrit quelles réactions le produisent ou le consomment. Ainsi sur la seule connaissance de la séquence, de l'annotation et des voies métaboliques de la levure, le réseau métabolique entier peut être manipulé. Nous présenterons par la suite (§I-4.4 et §I-4.6), les méthodes mathématiques ("Metabolite Flux Analysis" et "Flux Balance Analysis") permettant de calculer les répartitions des flux métaboliques à partir de la matrice de stœchiométrie du réseau métabolique.

I-4.2 Modèles stœchiométriques de la levure

Les premiers modèles stœchiométriques développés chez la levure se sont focalisés sur le métabolisme carboné central de cet organisme et comprennent un nombre restreint de réactions (environ 40-70) et de métabolites (40-50) (Nissen et al., 1997; Fiaux et al., 2003; Gombert et al., 2001). Ces modèles permettent d'analyser la distribution des flux chez la levure au travers de la glycolyse, de la voie des pentoses phosphates, du cycle TCA, des voies de production d'éthanol, d'acétate et de glycérol et des réactions anaplérotiques tout en prenant en compte la réversibilité des réactions enzymatiques, la compartimentation des métabolites dans le cytoplasme et la mitochondrie et les échanges de composés entre ces deux compartiments. Suite au séquençage du génome de *S. cerevisiae*, des modèles de reconstruction métabolique à l'échelle de son génome, qui incluent donc la majorité des

réactions identifiées chez cet organisme, ont été développés. Ainsi, le réseau métabolique "genome-scale" publié par Forster en 2003 (noté iFF708) répertorie 1175 réactions biochimiques, identifiées à partir des données de génomique des données de génomique (16 % des ORF annotées chez *S. cerevisiae*) et impliquant 733 métabolites cytosoliques et mitochondriaux (**Tableau 2**). Des versions améliorées de ce modèle ont permis de décrire plus précisément les différentes isoenzymes (iLL672), de prendre en compte d'autres compartiments dans la cellule, 8 au total (iND750), ou de détailler le métabolisme lipidique (iIN800). La dernière version mise à jour détaille plus précisément les interactions entre les voies métaboliques (Yeast 4.0).

I-4.3 Les contraintes stœchiométriques

La quantification de l'ensemble des flux repose sur l'application de contraintes sur le réseau métabolique. La première étape consiste à prendre en compte la conservation de la masse : l'accumulation d'un métabolite est directement liée à la différence entre sa vitesse de production et sa vitesse de consommation. Cela va engendrer des contraintes stœchiométriques sur les flux métaboliques.

Le réseau métabolique est décrit sous forme d'un système d'équations traduisant le bilan de masse pour chaque métabolite. De façon plus spécifique, en notant m_i la concentration d'un métabolite, et en supposant que ce métabolite est produit par une réaction i à laquelle on associe le flux métabolique v_i , et consommé par une réaction j , à laquelle on associe le flux métabolique v_j , le bilan de masse pour le métabolite m_i s'écrit :

$$\frac{dm_i(t)}{dt} = v_i(t) - v_j(t) \text{ (Equation 1).}$$

L'ensemble du réseau stœchiométrique s'écrit donc sous forme matricielle en décrivant le bilan de masse pour tous les métabolites :

$$\frac{dm(t)}{dt} = Sv(t) \text{ (Equation 2)}$$

Modèle	Gènes	% ORF définis	Réactions	Métabolites	Référence	Commentaires
iFF708	708	15.2	1175	825	Forster et al., 2003	1 ^{er} modèle
iND750	750	16.1	1489	972	Duarte et al., 2004	Ajout de la compartimentation
iLL672	672	14.1	1038	636	Kuepfer et al., 2005	Ajout de certaines isoenzymes
iIN800	800	17.2	1446	1013	Nookaew et al., 2008	Description plus fine du métabolisme des lipides
Yeast 4.0	924	51.2	1102	924	Dobson et al., 2010	Dernière version

Tableau 2 : Comparaison de la composition des modèles métaboliques à l'échelle du génome de *S. cerevisiae*

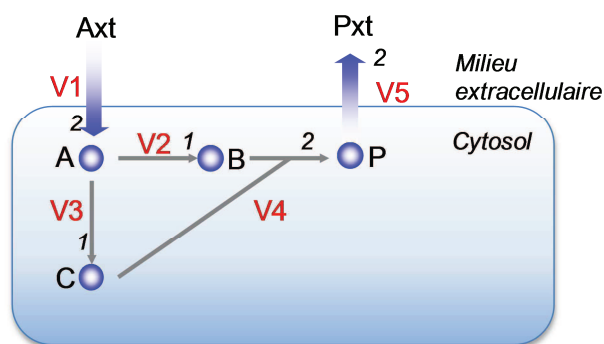


Figure 1 : Exemple d'un réseau stœchiométrique

où $m = (m_1, \dots, m_p)^T$ désigne le vecteur des métabolites, $v = (v_1, \dots, v_n)^T$ le vecteur des flux métaboliques et S est la matrice de stœchiométrie. Afin d'illustrer la construction de la matrice S , prenons l'exemple du réseau représenté sur la **Figure 1** comprenant 5 réactions et 6 métabolites (A_{xt} , A , B , C , P et P_{xt}) dont une entrée de carbone (A_{xt}) et un métabolite excrété (P_{xt}).

Le bilan massique appliqué à chaque intermédiaire, conduit au système d'équations :

$$\begin{cases} dA/dt = v_1 - v_2 - v_3 \\ dB/dt = v_2 - v_4 \\ dC/dt = v_3 - v_4 \\ dP/dt = v_4 - v_5 \end{cases}$$

En écrivant ce système sous sa forme matricielle, on peut donc en déduire S :

$$S = \begin{pmatrix} 1 & -1 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & -1 \end{pmatrix}$$

En considérant le système précédent à l'état de pseudo-équilibre ($\frac{dm}{dt} = 0$), un ensemble de contraintes linéaires est obtenu, *i.e* les inconnues (ici le vecteur de flux v) apparaissent de façon linéaire dans les équations :

$$Sv = 0 \text{ (Equation 3).}$$

En mesurant quelques flux, il est ainsi possible, dans certains cas, de résoudre de façon directe le système d'équations linéaires et donc de calculer la répartition de flux métaboliques. En état de pseudo-équilibre, il n'y a pas d'accumulation de métabolites intermédiaires, leurs concentrations restent constantes : la vitesse de formation d'un métabolite est égale à sa vitesse de consommation. D'un point de vue expérimental, cette hypothèse implique de réaliser les expériences soit en culture continue (mode de culture stable par définition), soit en

phase exponentielle de croissance, pour laquelle l'hypothèse de régime pseudo-permanent est vérifiée.

Reprenons notre exemple de la **Figure 1** et supposons que le système soit en l'état de pseudo-équilibre. La matrice S est de rang plein, ce qui signifie que la mesure d'un seul flux suffit à déterminer tous les autres. A l'inverse, si S n'est pas de rang plein, il est nécessaire de mesurer plusieurs flux. De façon générale, en particulier pour les modèles "genome-scale", le système d'équations associé $S \cdot v = 0$ est sous-déterminé. Différentes approches ont alors été développées afin d'obtenir une solution à cet ensemble d'égalités. Nous ne détaillerons pas ici l'ensemble de ces approches, mais uniquement celles utilisées dans le cadre de cette thèse.

I-4.4 Principe de l'approche de l'analyse métabolique des flux (MFA)

L'approche MFA consiste à résoudre le système à partir de la mesure expérimentale de certains flux. De façon pratique, les flux accessibles expérimentalement sont en général les flux de consommation des nutriments du milieu, les flux de production de métabolites excrétés et les flux vers les précurseurs pour la synthèse de biomasse (Valino and Stephanopoulos, 1993).

Dans ces conditions, il suffit de décomposer le vecteur v en flux mesurés v_m (substrats et produits excrétés) et en flux à calculer v_c . La matrice S est également partitionnée en regroupant les lignes contenant des coefficients non nuls pour v_m . Nous obtenons alors :

$$Sv = S_m v_m + S_c v_c = 0 \text{ (Equation 4).}$$

Suivant l'exemple de la **Figure 1**, elle est décrite par :

$$\begin{bmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix} A_{xt} + \begin{bmatrix} -1 & -1 & 0 \\ 1 & 0 & -1 \\ 0 & 1 & -1 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} A \\ B \\ C \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ -1 \end{bmatrix} P_{xt} = 0.$$

Sous l'hypothèse que la matrice S_c soit inversible, on obtient :

$$v_c = -S_c^{-1} S_m v_m \text{ (Equation 5).}$$

La méthode de MFA est donc une approche simple à mettre en œuvre qui permet d'avoir un aperçu de la distribution des flux dans le cas de systèmes simples. Cependant, dans la plupart des cas, le nombre de flux à déterminer dépasse le rang de la matrice stœchiométrique S (nombre de réactions), c'est-à-dire que la mesure des flux de métabolites extracellulaires consommés ou excrétés n'est pas suffisante pour calculer la distribution de flux métaboliques. En outre, cette méthode ne permet pas d'affiner simplement la représentation de la cellule. Par exemple, cette représentation ne permet pas d'introduire de contraintes thermodynamiques comme le caractère réversible ou irréversible des réactions chimiques et de prendre en compte la nature et l'état d'oxydation des cofacteurs.

A ce stade, il faut donc soit augmenter le nombre de données expérimentales pour lever l'indétermination (méthode ^{13}C -MFA), soit choisir une distribution de flux parmi l'ensemble des possibles à travers un critère de sélection (méthode FBA, §I.4.6).

I-4.5 Analyse des flux métaboliques par marquage isotopique (^{13}C -MFA)

D'autres approches, regroupées sous la dénomination de ^{13}C -MFA ou analyse ^{13}C -flux, intègrent deux types de données biologiques pour contraindre le système et le résoudre : des données de mesures de flux extracellulaires (comme l'approche MFA) mais aussi des données de filiation au ^{13}C , qui renseignent sur la distribution du flux carboné au niveau de certains nœuds du métabolisme carboné central (Wiechert et al., 2001). La filiation du ^{13}C au travers du réseau métabolique est en règle générale analysée au niveau des acides aminés protéinogéniques par RMN ou spectrométrie de masse. Ces composés, qui reflètent directement le profil de marquage des précurseurs intermédiaires du métabolisme carboné central dont ils sont issus, présentent l'avantage d'avoir un turn-over relativement lent. Des approches de mesure directe du taux de marquage dans les intermédiaires métaboliques ont été limitées par des problèmes méthodologiques, liés au turn-over très rapide des composés (van Winden et al., 2001). Les informations obtenues par les expériences de filiation dépendent fortement de la stratégie de marquage utilisée. L'utilisation du $[1-^{13}\text{C}]$ permet déterminer la distribution des carbones de la partie haute de la glycolyse (Nielsen, 2003). Cependant, un mélange de glucose non marqué et de glucose uniformément marqué $[U-^{13}\text{C}]$ est plus adapté pour déterminer les flux après le phosphoénolpyruvate ainsi que les flux réversibles (Fischer et al., 2004). La meilleure résolution sur l'ensemble du réseau

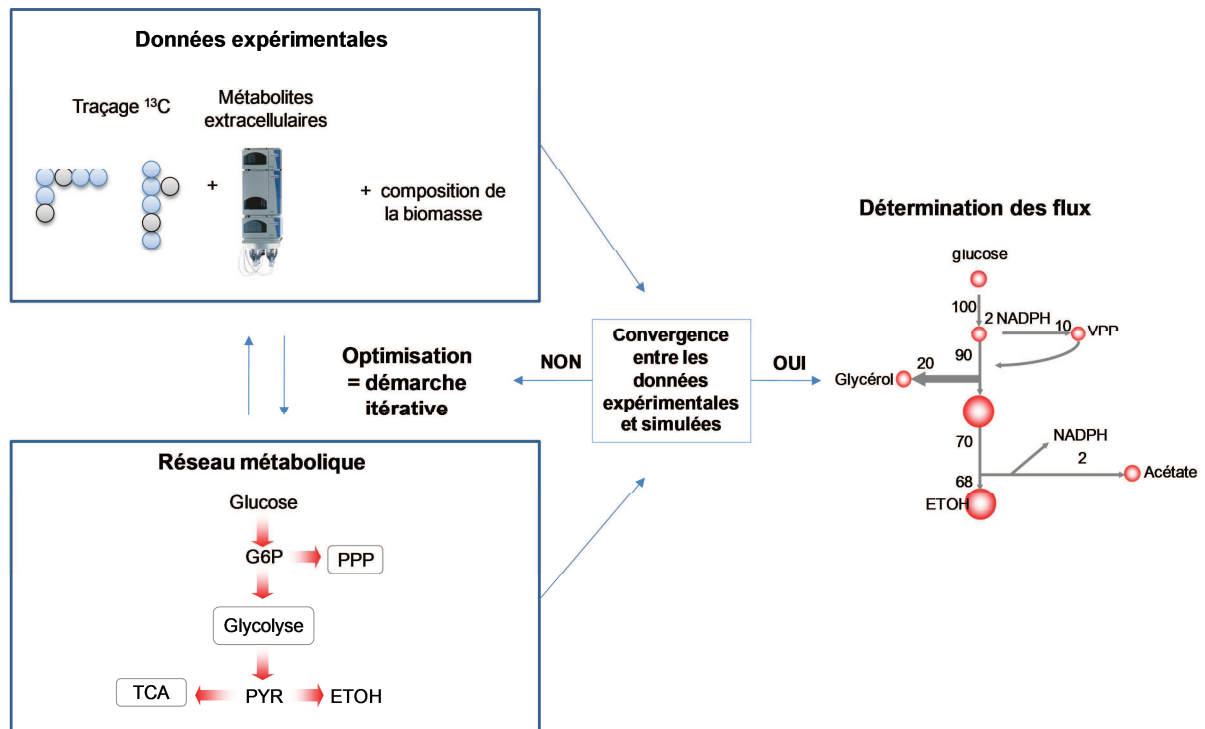


Figure 2 : Démarche utilisée dans les expériences d'analyse de flux métaboliques par marquage isotopique

métabolique a été obtenue en combinant [U- ^{13}C]glucose et [1- ^{13}C]glucose (Fischer et al., 2004). L'intégration des données isotopiques pour la détermination de la répartition des flux au travers d'un réseau métabolique est basée sur la réalisation de bilans isotopiques : une démarche de bilan massique (identique à celle développée pour l'approche MFA) est alors appliquée sur l'ensemble des atomes de carbone des molécules portant le marquage. En parallèle, un bilan massique est appliqué sur chaque intermédiaire du métabolisme carboné central. Ainsi, le nombre de relations reliant les flux entre eux est augmenté, et conduit en général à un système solvable. L'ensemble des équations écrites sous forme matricielle, constitue la base du modèle mathématique permettant de calculer la distribution complète des flux, soit suivant l'approche MFA classique (Sauer et al., 1997), soit à l'aide d'un algorithme mathématique itératif (Gombert and Nielsen, 2000). Le principe de cet algorithme d'ajustement est de minimiser, grâce à une procédure itérative, l'erreur entre les données expérimentales et les données simulées par le modèle à partir d'une proposition de flux (**Figure 2**). Ainsi la répartition des flux au niveau des nœuds du métabolisme carboné central est déterminée.

Un des avantages majeurs de cette démarche est que les contraintes liées à la résolution mathématique du système sont moins importantes, ce qui permet de considérer certains aspects physiologiques non pris en compte par les approches de type MFA : discrimination entre deux voies possibles de formation d'un produit, prise en compte de la réversibilité des réactions, quantification des flux au travers de cycles, compartimentation de certaines réactions.... De plus, dans la démarche de résolution du système de type algorithmique, les données expérimentales ne sont pas utilisées directement dans le calcul de flux et constituent un critère de validation de la solution proposée. Par contre, les limites de cette approche sont de n'être applicable que pour des cellules en croissance et de ne considérer que les intermédiaires métaboliques précurseurs des acides aminés protéinogéniques. D'autre part, ce mode de résolution ne peut être utilisé que pour des réseaux métaboliques comportant un nombre de réactions limité (environ une centaine), et ne convient donc pas pour la résolution de réseaux "genome-scale".

I-4.6 Approche Flux Balance Analysis (FBA)

Contrairement aux approches MFA et ^{13}C -MFA, l'approche FBA permet d'obtenir une distribution de flux pour les descriptions de type "genome-scale". Cette approche trouve ses bases sur le rationnel suivant : la compétition entre les microorganismes et la sélection naturelle conduisent à sélectionner les microorganismes capables de tirer partie au mieux des ressources disponibles dans le milieu pour produire "leur biomasse". Cela conduit alors à définir une méthode, basée sur la résolution d'un problème d'optimisation, qui détermine la répartition(s) des flux à travers le réseau métabolique qui maximise la production de la biomasse (Varma and Palsson, 1994). L'intérêt de cette approche est double : (i) elle permet de manipuler le réseau métabolique dans toute sa complexité et sa globalité (sans réelle restriction de taille) et (ii) elle offre une méthode permettant sur la seule base de la connaissance du réseau stœchiométrique, de la composition de la biomasse et des contraintes induites par les ressources disponibles dans le milieu de prédire de façon satisfaisante le taux de croissance et la répartition des flux métaboliques. Cette méthode peut être utilisée pour prédire les effets induits par la délétion de certaines réactions dans un milieu donné ou encore pour définir des stratégies d'ingénierie métabolique (Forster et al., 2003; Patil et al., 2004).

La méthode FBA pose le problème de prédiction des flux métaboliques en phase exponentielle de croissance (état de pseudo-équilibre) comme un problème d'optimisation sous contraintes, par l'intermédiaire de la maximisation d'une fonction objectif, qui peut être écrit sous la forme :

$$\text{Maximiser } c^T v$$

$$\text{soumis à } S \cdot v = 0$$

$$\text{et à } \alpha_i \leq v_i \leq \beta_i$$

où $v = (v_1, \dots, v_m)$ désigne le vecteur des flux métaboliques en régime permanent, S est la matrice traduisant les contraintes stœchiométriques du réseau métabolique, α_i et β_i définissent l'intervalle de valeurs admissibles pour le pour chaque flux v_i , et c désigne la fonction objectif du critère d'optimisation. Comme pour l'approche MFA, l'ensemble des contraintes égalités $Sv = 0$ correspond à la conservation de la masse dans le réseau métabolique à l'état stationnaire. Ce problème d'optimisation correspond à un problème dit de "programmation linéaire" (LP).

Des algorithmes de calcul efficaces permettent alors la résolution numérique du système en un temps raisonnable même pour des réseaux métaboliques à l'échelle du génome ("genome-scale"), comportant un nombre très important d'inconnues (Boyd and Vandenberghe 2004).

Identification des bornes α_i et β_i : Les bornes α_i et β_i permettent d'imposer des contraintes supplémentaires sur les flux, et donc de réduire l'ensemble des solutions possibles définies par les contraintes de conservation de masse. Elles sont déterminées expérimentalement ou traduisent une contrainte thermodynamique. Cela permet en particulier de prendre en compte l'irréversibilité des réactions (la valeur d'une des bornes est fixée à 0), ou d'imposer la valeur d'un flux à sa valeur mesurée ($v_i = \alpha_i = \beta_i$).

Choix de la fonction objectif c : Comme nous l'avons déjà mentionné, dans la plupart des études utilisant l'approche FBA pour accéder à la répartition des flux dans le réseau métabolique, la fonction objectif consiste à maximiser la vitesse de formation de l'organisme, ce qui conduit à maximiser la vitesse de production de l'ensemble des métabolites précurseurs pour la synthèse cellulaire (Kauffman et al., 2003; Nielsen, 2003). Un choix alternatif serait par exemple de maximiser la vitesse de production d'un produit d'intérêt comme l'éthanol (Cakir et al., 2004) ou de minimiser la vitesse de consommation d'ATP permettant ainsi l'analyse du réseau métabolique en absence de croissance (Vargas, et al. 2011).

Néanmoins, même si l'approche FBA s'est avérée efficace en pratique, son pouvoir prédictif est souvent réduit par les simplifications et les approximations utilisées lors de sa mise en œuvre pratique. La simplification la plus courante concerne la composition de la biomasse. Il est souvent d'usage de considérer une composition constante alors qu'il s'avère que sur beaucoup d'organismes celle-ci dépend du taux de croissance (Pramanik and Keasling, 1997). Par ailleurs, des approximations sont souvent faites lors de la caractérisation des besoins pour la biomasse. La plus classique est celle touchant au besoin énergétique global dépendant directement du taux de croissance. Enfin, certaines contraintes stœchiométriques peuvent être omises du fait d'incertitudes existantes sur certaines réactions du modèle. L'exemple le plus classique est celui touchant à l'équilibre des protons (H^+) qui est toujours relaxée en ajoutant un flux de protons transportés réversible et fictif. Les connaissances attachées aux réactions et aux phénomènes contribuant à cet équilibre restent trop incertaines pour être directement intégrées dans les modèles.

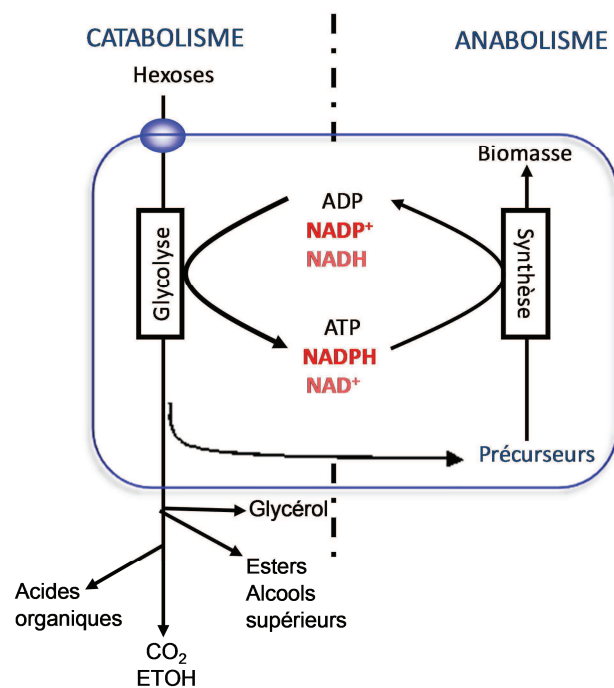


Figure 3 : Vision synthétique du métabolisme fermentaire

En outre, la méthode FBA initialement décrite par Varma et al. (1994) ne permet pas de reproduire certains phénomènes bien connus comme la répression catabolique, sans ajouter de contraintes explicites sur les flux d'entrée à travers les bornes α_i et β_i . Un des enjeux actuels de la biologie des systèmes est l'intégration des données acquises à différents niveaux de l'échelle cellulaire dans les modèles d'analyse des flux métaboliques, notamment celles concernant la régulation génétique et enzymatique. Ainsi de nombreux raffinements ont été proposés par la suite afin d'améliorer le pouvoir de prédiction des FBA. Nous ne ferons pas ici la liste exhaustive de l'ensemble de ces méthodes. Nous soulignons ici néanmoins les deux grandes tendances actuelles :

(i) L'intégration de la transcription et des régulations génétiques à travers la modulation des bornes α_i et β_i : Les premiers travaux datent de 2001 pour *E. coli* (Covert et al., 2001) et ont été poursuivis sur la levure (Herrgard et al., 2006). Le modèle intègre la régulation de l'expression génique suivant un modèle on/off (présence ou non de la réaction) par l'intermédiaire d'opérateurs logiques Booléens (Herrgard et al., 2006). D'autres algorithmes moins drastiques que les contraintes on/off sont actuellement développés afin de pouvoir moduler le niveau d'un flux dans une réaction en fonction du niveau d'expression des gènes impliqués (van Berlo et al., 2011).

(ii) La prise en compte d'autres contraintes structurelles : ce domaine de recherche est actuellement en plein essor afin de développer des algorithmes qui permettent de remodeler la forme de l'espace des solutions de flux par ajout de nouveaux types de contraintes et d'augmenter ainsi le pouvoir de prédiction des modèles (Park et al., 2009, Goelzer, et al. 2011). Notamment la méthode FBAwMC qui intègre explicitement le volume cellulaire (Vazquez et al., 2008; Beg et al. 2007), la méthode RBA (Goelzer et al., 2009, Goelzer, et al. 2011) intégrant à la fois le volume cellulaire et la production des protéines, ou encore les travaux de Zhuang et al. (2011) intégrant une contrainte sur la surface membranaire.

II- Métabolisme et équilibre redox en fermentation

II-1 *S. cerevisiae* : un métabolisme flexible

Le métabolisme est constitué de processus de dégradation (catabolisme) et de synthèse organique (anabolisme) (**Figure 3**). Le catabolisme génère l'énergie sous forme d'ATP et des précurseurs pour la synthèse de la matière (biomasse).

S. cerevisiae, microorganisme aérobic facultatif et Crabtree positif, présente la caractéristique de convertir rapidement les sucres en éthanol et dioxyde de carbone à la fois en conditions anaérobies et en conditions aérobies.

En fonction des conditions d'oxygénation et de la nature et quantité de substrat carboné, on distingue trois types de métabolisme :

(i) Le métabolisme respiratoire, en présence d'oxygène lorsque la concentration de glucose est inférieure à 150 mg.L^{-1} (Verduyn et al., 1984) ou en culture de type chemostat lorsque la vitesse d'apport de glucose est inférieure au taux de dilution critique ($D = 0.2 \text{ h}^{-1}$ pour la souche CEN.PK-122) (van Dijken et al., 1986). En métabolisme oxydatif, le rendement de biomasse (estimé en gramme de poids sec de levures) est à son maximum ($Y_{X/SCENPK} 113.7D = 0.38 \text{ g.g}^{-1}$ de glucose pour $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$). Dans ces conditions, les cofacteurs réduits NADH et FADH_2 produits par la glycolyse et le cycle de Krebs sont réoxydés au niveau de la chaîne respiratoire. En condition respiratoires, 28 molécules d'ATP sont formées par molécule de glucose.

(ii) En présence d'oxygène et de glucose, la fermentation et la respiration coexistent. Le métabolisme respiro-fermentaire se caractérise par (i) une diminution du rendement de la biomasse, (ii) la production de métabolites secondaires tels que l'éthanol, le glycérol et l'acétate, et (iii) une vitesse spécifique de consommation d'oxygène réduite. En métabolisme respiro-fermentaire, seulement environ 3 % des carbones sont respirés (Gancedo and Serrano, 1989).

(iii) En absence d'oxygène (métabolisme fermentaire), le rendement de biomasse diminue de 10 fois par rapport aux conditions aérobies et 8 fois moins d'ATP est produit (Bakker et al., 2001; Verduyn et al., 1991). La dégradation par voie glycolytique d'une molécule de glucose génère la production nette de 2 moles d'ATP, de 2 moles de NADH et de 2 moles de pyruvate. Le flux glycolytique est très élevé par rapport à un métabolisme aérobie (20 fois

plus grand), générant une quantité importante de NADH. La conversion du pyruvate en éthanol permet la réoxydation, via l'alcool déshydrogénase Adh1p, d'une molécule de NADH par molécule d'éthanol produite (**Annexe 1**). D'un point de vue d'oxydo-réduction, le bilan de la transformation de glucose en éthanol est donc nul (van Dijken and Scheffers, 1986).

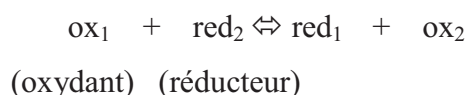
Dans notre étude, nous nous focaliserons sur le métabolisme fermentaire, en particulier en conditions œnologiques.

La fermentation en conditions œnologiques se déroule en quasi anaérobiose. Le moût de raisin est caractérisé par une forte concentration en sucres (20-26%, mélange équimolaire glucose/fructose), un pH acide (2,9-3,6) et de faibles teneurs en azote, en oxygène (40 – 100 mg/l) et en micronutriments (vitamines, lipides). Dans ces conditions, environ 92 % du carbone est converti en éthanol et CO₂, 2 % sont utilisés pour la formation de biomasse et 6 % pour la synthèse de sous-produits fermentaires (glycérol, acides organiques, esters, alcools supérieurs).

En fermentation, le TCA a une activité fortement réduite mais qui reste nécessaire pour fournir des céto-acides en C4 et C5, précurseurs de la synthèse des acides aminés (**Annexe 1**). Le complexe succinate déshydrogénase, soumis à une double répression par le glucose et l'anaérobiose, n'étant pas actif (Camarasa et al., 2003), le TCA fonctionne sous forme d'une branche oxydative et d'une branche réductrice conduisant toutes deux à la formation de succinate (Gombert, et al. 2001 ; Maaheimo et al., 2001) (**Annexe 2**). La branche réductrice est la principale voie de production de succinate en fermentation œnologique (Camarasa et al., 2007).

II-2 Cofacteurs et équilibres redox

Le maintien de l'homéostasie redox est essentiel pour le fonctionnement du métabolisme. Le potentiel redox permet de caractériser le transfert d'électrons d'un réducteur (espèce chimique à potentiel redox très négatif) vers un oxydant (espèce chimique à potentiel redox plus élevé) lors des réactions d'oxydo-réduction :



Potentiel d'oxydo-réduction		
Oxydant	Reductant	E' ₀ (V)
Succinate + CO ₂	α-cétoglutarate	-0.67
Acetate	Acétaldéhyde	-0.60
Ferredoxin (oxidized)	Ferredoxin (reduced)	-0.43
2 H ⁺	H ₂	-0.42
NAD ⁺	NADH + H ⁺	-0.32
NADP ⁺	NADPH + H ⁺	-0.32
Lipoate (oxidized)	Lipoate (reduced)	-0.29
Glutathione (oxidized)	Glutathione (reduced)	-0.23
FAD	FADH ₂	-0.22
Acétaldéhyde	Ethanol	-0.20
Pyruvate	Lactate	-0.19
Fumarate	Succinate	0.03
Cytochrome b (+3)	Cytochrome b (+2)	0.07
Dehydroascorbate	Ascorbate	0.08
Ubiquinone (oxidized)	Ubiquinone (reduced)	0.10
Cytochrome c (+3)	Cytochrome c (+2)	0.22
Fe (+3)	Fe (+2)	0.77
1/2O ₂ + 2 H ⁺	H ₂ O	0.82

Tableau 3 : Potentiel standard des réactions d'oxydo-réduction à pH 7.0 à 25°C

Métabolites	Nombre de réactions
H ⁺	229
ATP	188
ADP	146
CO ₂	90
NADP ⁺	85
NADPH	79
NAD ⁺	77
NADH	65

Tableau 4 : Métabolites les plus connectés du réseau stœchiométrique de *S. cerevisiae* (Nielsen, 2003)

Plus la différence de potentiel entre l'accepteur (oxydant) et le donneur (réducteur) d'électrons est élevée, plus la réaction enzymatique est exergonique ($\Delta G < 0$), et plus l'énergie libérée est grande. Si la différence de potentiel est négative, la réaction nécessite une source d'énergie extérieure. Chaque couple redox est classé en fonction de son potentiel d'oxydoréduction, l' O_2 étant le meilleur accepteur d'électrons du fait de son potentiel redox très élevé (**Tableau 3**).

Dans la cellule, les cofacteurs $NADPH/NADP^+$ et $NADH/NAD^+$ sont les principaux couples accepteurs/donneurs d'électrons pour les réactions d'oxydo-réduction du métabolisme. Ces cofacteurs interviennent dans de nombreuses réactions : 4,5 % des gènes caractérisés chez *S. cerevisiae* codent des oxydo-réductases (*SGD*, <http://www.yeastgenome.com>) et 15% des réactions métaboliques sont des réactions d'oxydoréduction. Ainsi, les couples redox $NADPH/NADP^+$ et $NADH/NAD^+$ font partie des métabolites les plus connectés du réseau métabolique (Nielsen, 2003) (**Tableau 4**).

Les cofacteurs NAD^+ et le $NADP^+$ ont des rôles bien distincts dans le métabolisme. Le $NADH$ est généré lors de la production d'énergie (ATP) par la glycolyse, tandis que le $NADPH$ est utilisé majoritairement comme agent réducteur des voies de biosynthèse. En conditions batch anaérobies en phase exponentielle (milieu minimum, 2,5 % glucose), les concentrations intracellulaires en $NADH$ et NAD^+ de 0.44 et 2.87 $\mu\text{mol.gDW}^{-1}$ et en $NADPH$ et $NADP^+$ de 1.21 et 0.23 $\mu\text{mol.gDW}^{-1}$ ont été décrites (Nissen et al., 2001). Le ratio $NADPH/NADP^+$ (5.3) est donc 35 fois plus grand que le ratio $NADH/NAD^+$ (0.15). Les cofacteurs redox ne pouvant diffuser à travers la membrane mitochondriale, les balances redox $NADH/NAD^+$ et $NADPH/NADP^+$ doivent être équilibrées dans le cytosol et la mitochondrie de façon indépendante (Jagow and Klingenberg, 1970). D'autre part, du fait de l'absence de transhydrogénase chez la levure, les possibilités d'échanges entre ces 2 couples sont limitées. Ces aspects seront développés dans les paragraphes suivants (§II-5.2 et §II-5.3).

Voie	Equation	Production NADH cytosolique	Production NADH mitochondrial
Ethanol (C_2H_6O)	$1/2 \text{ Glucose} + 1 \text{ ADP} \Rightarrow 1 \text{ éthanol} + 1 \text{ ATP} + 1 \text{ CO}_2$	0	
Glycérol ($C_3H_8O_3$)	$1/2 \text{ Glucose} + 1 \text{ NADH} + 1 \text{ ATP} \Rightarrow 1 \text{ glycérol} + 1 \text{ NAD}^+ + 1 \text{ ADP}$	0	
Pyruvate ($C_3H_4O_3$)	$1/2 \text{ Glucose} + 1 \text{ NAD}^+ + 1 \text{ ADP} \Rightarrow 1 \text{ pyruvate} + 1 \text{ NADH} + 1 \text{ ATP}$	1	
Acétaldéhyde (C_2H_4O)	$1/2 \text{ Glucose} + 1 \text{ NAD}^+ + 1 \text{ ADP} \Rightarrow 1 \text{ acétaldéhyde} + 1 \text{ CO}_2 + 1 \text{ NADH} + 1 \text{ ATP}$	1	
Acétate ($C_2H_4O_2$)	$1/2 \text{ Glucose} + 1 \text{ NAD}^+ + 1 \text{ NADP}^+ + 1 \text{ ADP} \Rightarrow 1 \text{ acétate} + 1 \text{ CO}_2 + 1 \text{ NADH} + 1 \text{ NADPH} + 1 \text{ ATP}$	1	
Acétoïne ($C_4H_8O_2$)	$\text{Glucose} + 2 \text{ NAD}^+ + 2 \text{ ADP} \Rightarrow \text{acétoïne} + 2 \text{ CO}_2 + 2 \text{ NADH} + 2 \text{ ATP} + 2 \text{ H}^+$	2	
2,3-butanediol ($C_4H_{10}O_2$)	$\text{Glucose} + \text{NAD}^+ + 2 \text{ ADP} \Rightarrow 2,3\text{-butanediol} + 2 \text{ CO}_2 + \text{NADH} + 2 \text{ ATP} + \text{H}^+$	1	
Succinate ($C_4H_6O_4$)	$1/2 \text{ Glucose} + 1 \text{ FADH}_2 + 1 \text{ CO}_2 \Rightarrow 1 \text{ succinate} + 1 \text{ FAD}$	0	
Succinate ($C_4H_6O_4$)	$1 \text{ Glucose} + 2 \text{ NAD}^+ + \text{NADP}^+ + 2 \text{ ATP} + 2 \text{ NADH} + \text{ADPm} \Rightarrow 1 \text{ succinate} + 2 \text{ NADH} + \text{NADPH} + 2 \text{ ADP} + 2 \text{ NADHm} + \text{ATPm} + 2 \text{ CO}_2\text{m}$	2	2
Succinate ($C_4H_6O_4$)	$1 \text{ Glucose} + 2 \text{ NAD}^+ + 1 \text{ ADP} + 3 \text{ NADHm} + 1 \text{ ADPm} \Rightarrow 1 \text{ succinate} + 2 \text{ NADH} + 1 \text{ ATP} + 3 \text{ NADHm} + 1 \text{ ATPm} + 2 \text{ CO}_2 + 3 \text{ CO}_2\text{m}$	2	3
Succinate ($C_4H_6O_4$)	$1/2 \text{ Glucose} \Rightarrow 1 \text{ succinate} + 1 \text{ NADHm} + 1 \text{ NADHm} + 1 \text{ FADm}$	1	1

Tableau 5 : Equations bilan de synthèse des différents sous produits impliquant la production ou la réoxydation du NADH

Il est à noter qu'en fonction du choix des transporteurs mitochondriaux, l'équation bilan de la production de succinate varie :

¹ transporteurs d'oxaloacétate et d'acétyl-CoA

² transporteurs d'oxaloacétate et de pyruvate

II-3 Métabolisme du NAD(H)

Le cofacteur NAD(H) est impliqué dans 65 réactions, correspondant à 6.3 % des réactions du réseau métabolique chez *S. cerevisiae* (Nielsen, 2003). Dans la mitochondrie, 11 réactions produisent du NADH et 4 le réoxydent. Dans le cytosol, le NADH est généré par 35 réactions et 15 produisent du NAD⁺.

II-3.1 Voies impliquées dans la synthèse du NADH

Le NADH est principalement produit par la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase, qui existe sous forme de 3 isoenzymes codées par les gènes *TDH1*, *TDH2* et *TDH3*. Les principales isoformes en fermentation sont Tdh2p et Tdh3p, Thd1p étant une isoforme mineure active en phase stationnaire (Delgado et al., 2001).

La formation des acides organiques et de certains sous-produits (le pyruvate, l'acétate, le succinate, l' α -cétoglutarate, l'acétoïne et le 2,3-butanediol) génère une production nette de NADH à partir du glucose (Tableau 5).

La synthèse des acides aminés, des nucléotides et des lipides génère également du NADH.

II-3.2 Réoxydation du NADH

En anaérobiose, la majeure partie du NADH produit par la glycolyse est réoxydé par la voie éthanol par l'alcool déshydrogénase Adh1p. La synthèse de biomasse et des sous produits fermentaires génère un excès de NADH, qui ne peut être réoxydé par la chaîne respiratoire. En conditions fermentaires, c'est la synthèse de glycérol qui permet de réoxyder le surplus de NADH cytosolique (van Dijken and Scheffers, 1986). Il est synthétisé en 2 étapes à partir du dihydroxyacétone-phosphate (DHAP). Le DHAP est réduit en glycérol 3-phosphate par une glycérol 3-phosphate déshydrogénase (GPDH) NADH-dépendante. Cette enzyme existe sous la forme de 2 isoenzymes codées par les gènes *GPD1* et *GPD2* (Larsson et al., 1993; Eriksson et al., 1995), qui ont des rôles distincts dans le métabolisme : *GPD1* a un rôle majeur dans la réponse au stress osmotique, alors que *GPD2* est induit par l'anaérobiose (Albertyn et al., 1994). En fermentation œnologique, c'est l'isoforme Gpd1p qui

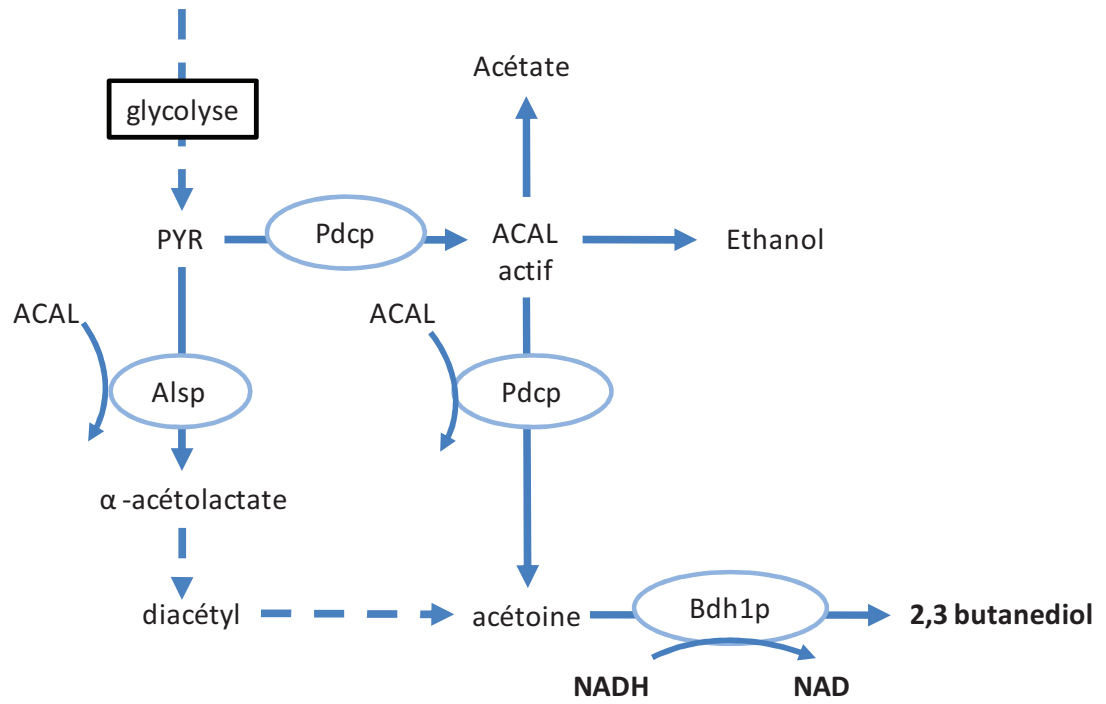
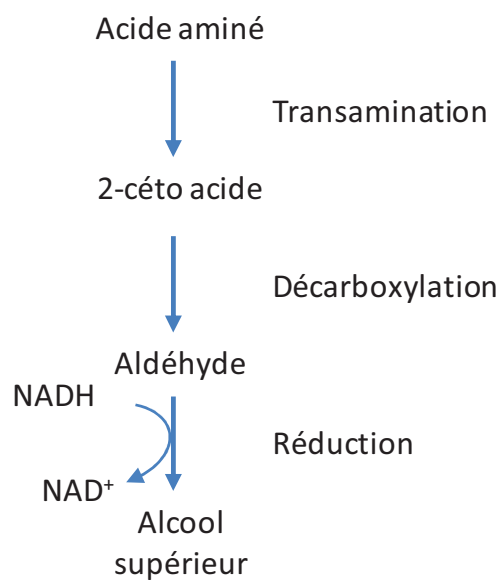


Figure 4 : Formation d'acétoïne et de 2,3 butanediol

est majoritaire (Remize et al., 2003). Le phosphate du glycérol 3-phosphate est ensuite hydrolysé de façon irréversible pour former du glycérol par une glycérol 3-phosphatase, codée par *GPP1* et *GPP2*. Là encore, ces 2 gènes sont régulés de façon différentielle, *GPP2* jouant un rôle dans le stress osmotique, alors que *GPP1* est induit en conditions anaérobies (Pahlman et al., 2001). La première étape (GPDH) est l'étape limitante de la formation de glycérol (Remize et al., 1999). Le rôle essentiel de soupape redox de la synthèse du glycérol est illustré par l'incapacité d'un double mutant *gpd1Δgpd2Δ* à croître en anaérobiose, ce défaut de croissance étant restauré par l'ajout d'un agent oxydant le NADH (Ansell et al., 1997; Björkqvist et al., 1997).

D'autres déshydrogénases NADH-dépendantes peuvent contribuer, de façon mineure, à l'équilibre d'oxydoréduction dans le cytoplasme, comme par exemple la butanediol déshydrogénase. Cette enzyme, située en "bout de chaîne" du MCC permet la production de

2,3-butanediol à partir d'acétoïne, constituant une voie de détoxification de l'acétaldéhyde (**Annexe 1**) (Michnick et al., 1997). L'acétoïne est produite à partir de l'acétaldéhyde par une activité annexe de la PDC, qui permet la formation d'un complexe d'acétaldéhyde activé (acétaldéhyde-thiamine-diphosphate). La condensation de ce complexe avec une molécule d'acétaldéhyde libre, ou avec une molécule de pyruvate, génère de l'acétoïne. Ce composé peut également être produit à partir de la réduction du diacétyl, formé par décarboxylation de l' α -acétolactate catalysée par l' α -acétolactate synthase (Alsp) (**Figure 4**) (González et al., 2001; Romano and Suzzi, 1996). La réduction de l'acétoïne en 2,3-butanediol est catalysée par une butanediol déshydrogénase NAD^+ -dépendante codée par *BDH1* (González et al., 2001), dont une activité secondaire est la conversion de diacetyl en acétoïne. Cette réaction est réversible, mais du fait de l'affinité de Bdh1p vis-à-vis de ses substrats (K_m acétoïne : 4,5 mM, K_m 2,3-butanediol : 14 mM), cette enzyme fonctionne préférentiellement dans le sens de la formation de 2,3-butanediol. Un mutant *bdh1Δ* produit 15% de moins de 2,3-butanediol que la souche sauvage, ce qui montre l'existence d'une autre enzyme, non identifiée à ce jour (González et al., 2010). Le flux à travers Bdh1p peut être limité par la faible disponibilité en NADH. Ainsi, des souches surproduisant du glycérol accumulent de grandes quantités d'acétoïne, du fait de la compétition pour le NADH entre les activités BDH et GPDH (Cambon et al., 2006).



**Figure 5 : Voie Ehrlich, catabolisme des acides aminés impliqués
dans la formation des alcools supérieurs**

Navettes NADH			
ACAL/ETOH	NAD^+_{c}	+ NADH_{m}	$\Rightarrow \text{NADH}_{\text{c}} + \text{NAD}^+_{\text{m}}$
MAL/OAA	NAD^+_{c}	+ NADH_{m}	$\Rightarrow \text{NADH}_{\text{c}} + \text{NAD}^+_{\text{m}}$
MAL/ASP	NAD^+_{m}	+ NADH_{c}	$\Rightarrow \text{NADH}_{\text{m}} + \text{NAD}^+_{\text{c}}$
Transporteur			
Ndt1p ou Ndt2p		NAD^+_{c}	$\Rightarrow \text{NAD}^+_{\text{m}}$

Tableau 6 : Systèmes d'échange du NAD(H) entre le cytosol et la mitochondrie

La balance NADH/NAD⁺ dans la mitochondrie est fortement contrainte. En effet, le NADH peut être réoxydé par seulement 2 réactions catalysées par la malate déshydrogénase (Mdh1p) et par l'alcool déshydrogénase (Adh3p).

Il existe 3 isoformes de la malate déshydrogénase codées par *MDH1*, *MDH2* et *MDH3*, localisées, respectivement, dans la mitochondrie, le cytosol et le peroxisome (Steffan et al., 1992; Samokhvalov et al., 2004). En fermentation, la malate déshydrogénase fonctionne dans le sens de la formation du malate. En présence de glucose, l'activité de la forme mitochondriale Mdh1p représente 90 % de l'activité malate déshydrogénase totale (Minard and McAlister-Henn, 1992; Steffan et al., 1992). Bien que le flux à travers Mdh1p, estimé par analyse ¹³C-flux soit très faible (Blank et al., 2005), un mutant *mdh1Δ* présente un flux d'entrée du glucose perturbé (diminution de 12.2 à 2.0 mmol.gDW⁻¹.h⁻¹). Cette réaction peut donc contribuer de façon non négligeable à la réoxydation du NADH mitochondrial.

La deuxième enzyme mitochondriale NADH-dépendante est Adh3p, qui peut réduire l'acétaldéhyde en éthanol. En conditions d'anaérobiose, le mutant *adh3Δ* présente une diminution de 30 % de la croissance (Bakker et al., 2000). Par analyse de flux métabolique, en présence de 2.5 % glucose, Nissen et collaborateurs (Nissen et al., 1997) ont montré qu'Adh3p est la voie majeure de réoxydation du NADH mitochondrial. Cependant, le fait que le mutant *adh3Δ* soit viable montre qu'il existe d'autres systèmes permettant cette réoxydation.

De nombreuses autres déshydrogénases participent à l'homéostasie NADH/NAD⁺ dans le cytosol ou la mitochondrie. Nous citerons 2 exemples, la famille des alcools déshydrogénases (ADH) et celles des acétaldéhydes déshydrogénases (ALD) NAD⁺-dépendantes. Il existe 5 Adhp NADH-dépendantes impliquées dans le métabolisme de l'éthanol : (i) Adh1p, l'enzyme majoritaire en fermentation, (ii) Adh2 active en présence d'éthanol comme source de carbone (Ciriacy, 1975). (iii) Adh3p, mitochondriale, impliquée dans la navette redox acétaldéhyde-éthanol et jouant un rôle dans l'équilibre redox mitochondrial (§II-3.3) (Nissen et al., 1997; Bakker et al., 2001) (iv) Adh4p et (v) Adh5p, localisées respectivement dans la mitochondrie et dans le cytoplasme, dont le rôle reste inconnu.

Ces enzymes sont également impliquées dans la formation des alcools supérieurs. Ces composés, bien que formés en faible quantité, contribuent significativement aux

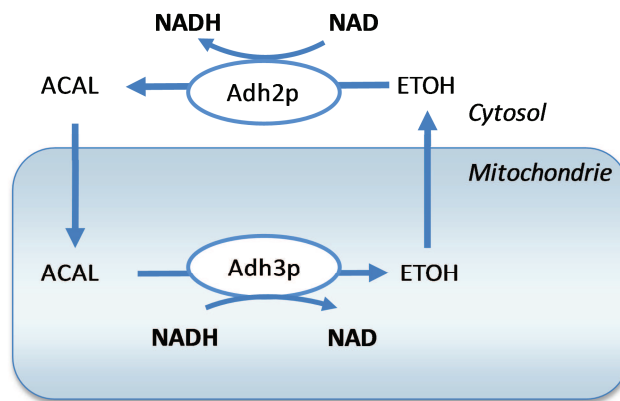


Figure 6 : Navette acétaldehyde-éthanol

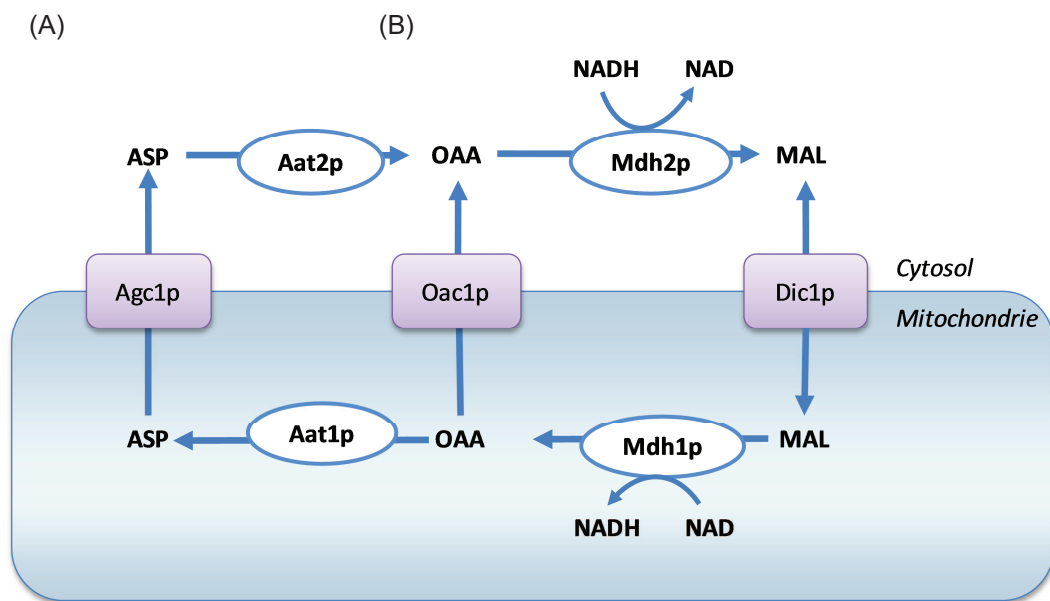


Figure 7 : Navettes malate/aspartate (A) et malate/oxaloacétate (B)

D'après Bakker, et al. (2001). Ces navettes permettant l'échange du NADH cytosolique en NAD^+ mitochondrial

caractéristiques aromatiques des boissons fermentées, notamment du vin. Ils sont synthétisés par dégradation des acides aminés par la voie de Ehrlich (Dickinson et al., 1997; Hazelwood et al., 2008), qui fait intervenir la transamination des acides aminés en céto-acides, la décarboxylation des céto-acides en aldéhyde et la réduction de ces derniers en alcool par une ou plusieurs déshydrogénases de la famille ADH (**Figure 5**).

Les acétaldéhydes déshydrogénases Ald2p et Ald3p peuvent être une source mineure de production de NADH notamment en conditions de stress, en particulier oxydatif lors desquels les gènes correspondant sont activés (Navarro-Aviño et al., 1999; Norbeck and Blomberg, 1997). Cependant, ces isoformes ne contribuent pas à la production d'acétate en conditions de fermentation (Saint-Prix et al., 2004), et ont plutôt un rôle dans la synthèse de β -alanine (White et al., 2003). De même Ald4p qui utilise de façon indifférenciée le NAD^+ ou le NADP^+ peut contribuer au maintien des pools redox.

II-3.3 Systèmes d'échange du NADH entre le cytoplasme et la mitochondrie

Il a longtemps été admis que la membrane interne de la mitochondrie est imperméable au NAD(H) et au NADP(H) (Jagow and Klingenberg, 1970). Cependant, un transporteur mitochondrial à NAD^+ a été identifié chez *S. cerevisiae* codé par *NDT1* (Todisco et al., 2006). La délétion du gène *NDT1* et de son homologue *NDT2* entraîne une réduction de la concentration en NAD^+ mitochondrial et un défaut de croissance sur source de carbone non fermentescible (2 % éthanol) mais n'a aucun effet lors de la croissance sur glucose (Todisco et al., 2006).

Il existe également différents systèmes (appelés navettes), basés sur le couplage de réactions, qui permettent l'échange des cofacteurs entre la mitochondrie et le cytosol (**Tableau 6**) :

(i) La navette acétaldéhyde-éthanol, qui repose sur le couplage des alcool déshydrogénases mitochondriale Adh3p et cytosolique Adh2p et sur la diffusion de l'acétaldéhyde et de l'éthanol entre les 2 compartiments (**Figure 6**), permet d'échanger du NADH mitochondrial avec du NADH cytosolique (Bakker et al., 2000). Le fonctionnement de cette navette est neutre d'un point de vue énergétique. Cependant Adh2p n'est pas active en fermentation (Ciriacy, 1975). Adh3p, quant à elle, est active en fermentation (§II-3.2) (Bakker

et al., 2000). Le couplage de cette enzyme avec l'entrée d'acétaldéhyde dans la mitochondrie et la sortie d'éthanol de ce compartiment déséquilibre la balance NADH/NAD⁺ cytosolique. L'entrée d'une mole d'acétaldéhyde dans la mitochondrie génère un surplus de NADH cytosolique du fait du détournement des carbones de la voie éthanol (Adh1p). Afin de rééquilibrer la balance NADH/NAD⁺ cytosolique, le NADH est réoxydé par la voie glycérol. Ainsi cette navette échange du NADH mitochondrial avec du NADH cytosolique (**Figure 6**). Indirectement, le glycérol joue donc également un rôle dans la réoxydation du NADH mitochondrial.

(ii) La navette malate-oxaloacétate (MAL/OAA) (**Figure 7**) est constituée par les isoformes cytosolique et mitochondriale Mdh2p et Mdh1p de la malate déshydrogénase et par les transporteurs de malate Dic1p et de l'oxaloacétate Oac1p. Bakker et collaborateurs (Bakker et al., 2001) ont décrit cette navette comme un système permettant d'échanger du NADH cytosolique avec du NAD⁺ mitochondrial. Cependant, en conditions d'anaérobiose, l'expression de *MDH2* est très faible (Ter Linde et al., 1999) et la protéine Mdh2p est rapidement dégradée en présence d'un excès de glucose (Minard and Mc-Alister Henn, 1992).

(iii) La navette malate-asparate (MAL/ASP) (**Figure 7**) peut permettre également l'échange du NADH cytosolique avec du NAD⁺ mitochondrial. Cette navette est identique à la navette MAL/OAA, sauf que l'oxaloacétate est converti en aspartate par les transaminases Aat2p et Aat1p localisées, respectivement, dans le cytosol et la mitochondrie et l'aspartate est exporté de la mitochondrie par Agc1p. Cependant, en fermentation, Mdh1p fonctionne préférentiellement dans le sens de la conversion de l'oxaloacétate en malate (Gombert et al., 2001; Maaheimo et al., 2001). Dans ces conditions, cette navette pourrait donc permettre de réoxyder le NADH mitochondrial (**Tableau 6**).

II-4 Métabolisme du NADP(H)

Le NADPH est un cofacteur important pour l'anabolisme (**Figure 3**) et également pour la protection contre le stress oxydatif. 79 réactions utilisent le NADPH (**Tableau 4**) ce qui correspond à 7.6 % des réactions du réseau métabolique chez *S. cerevisiae* (Nielsen, 2003). Dans le cytosol, 32 réactions consomment du NADPH et 23 sont impliquées dans sa

production. Dans la mitochondrie, 17 réactions consomment du NADPH et 7 permettent sa production.

II-4.1 Synthèse du NADPH

Dans le cytoplasme, la voie majoritaire de formation du NADPH est la voie des pentoses phosphates (VPP). Le NADPH peut être également formé par l'acétaldéhyde déshydrogénase Ald6p. Un double mutant *zwf1Δald6Δ* est incapable de croître sur glucose (Grabowska and Chelstowska, 2003) ce qui montre que ce sont les deux seules voies permettant de répondre aux besoins de la cellule en NADPH lors d'une croissance sur glucose.

II-4.1.1 La voie des pentoses phosphates (VPP)

La VPP est une voie alternative à la glycolyse à partir du glucose-6-phosphate pour la production des intermédiaires métaboliques F6P et glycéraldéhyde-3-phosphate (**Figure 8**). Elle a un rôle central dans la cellule pour la formation du NADPH et des précurseurs pour la synthèse de la biomasse : le D-ribose 5-phosphate (R5P) et l'érythrose-4-phosphate (E4P) (Gancedo and Lagunas, 1973; Bruinenberg et al., 1983; Thomas et al., 1991; Nogae and Johnston, 1990).

Le segment oxydatif est constitué de réactions irréversibles conduisant à la conversion de glucose-6P en ribulose-5P et CO₂. Le NADPH est formé par la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) codée par *ZWF1* et par la 6-phosphogluconate déshydrogénase codée par *GND1* et *GND2*. Le segment non oxydatif, permet par l'action de transcétoleses (*TKL1*, *TKL2*) d'aldolase (*TAL1*) d'épimérase (*RPE1*) et d'isomérase (*RKII*) l'interconversion entre les intermédiaires de la VPP (ribulose 5P, ribose 5P, xylulose 5P, erythrose4P, sedoheptulose 7-P, F6P, glycéraldéhyde 3-P). Gnd1p et Tkl1p sont les isoenzymes majoritaires sur glucose (Dickinson and Kruckeberg, 2006; Sinha and Maitra 1992).

Cette voie est fortement connectée à d'autres voies du métabolisme central. Ainsi, le R5P est converti en 5-phosphoribosyl-1-PP (PRPP), précurseur de la synthèse des purines des pyrimidines, de l'histidine et du tryptophane (**Figure 8**). L'érythrose-4-phosphate (E4P) est impliqué dans la synthèse du chorismate (impliquant les gènes *ARO1-4*), précurseur des

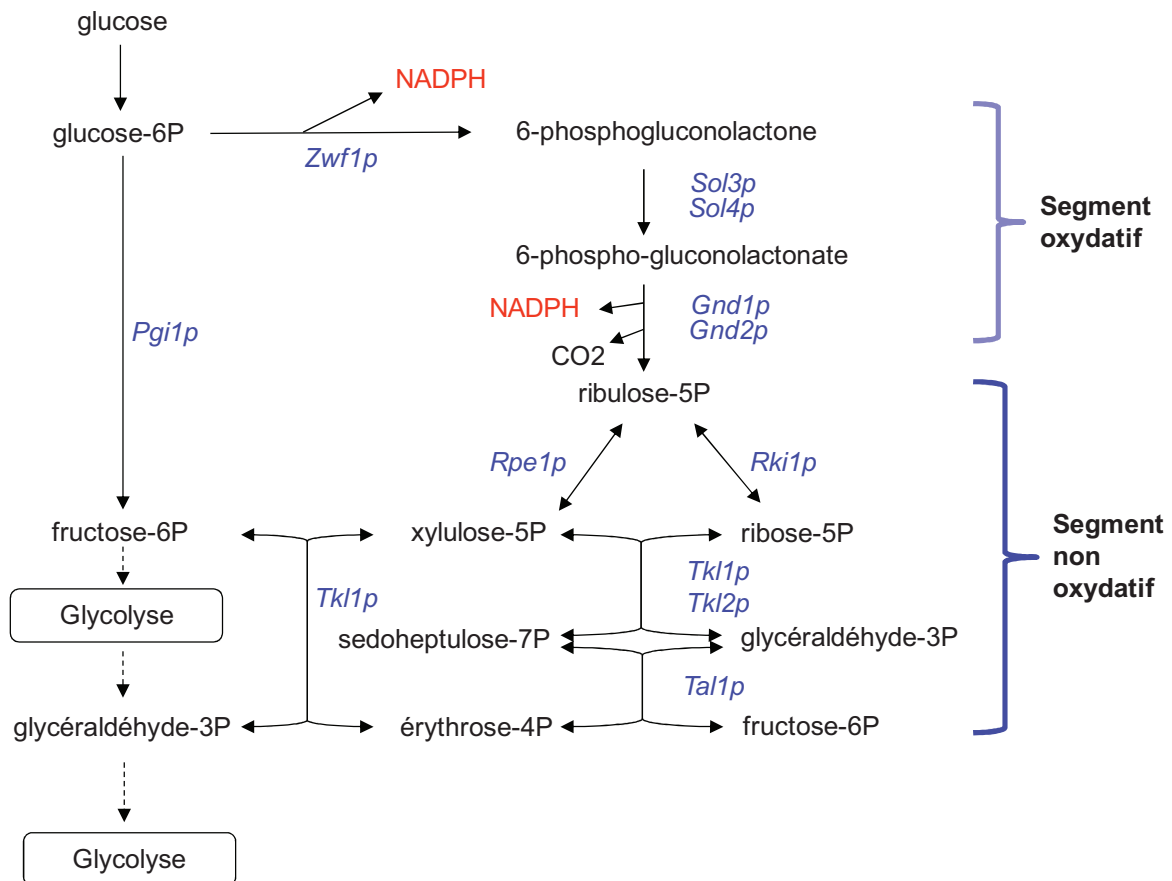


Figure 8 : Voie des pentoses phosphates (VPP)

Pgi1p, phosphoglucose isomérase ; *Zwf1p*, glucose-6-phosphate déshydrogénase; *Sol3p* et *Sol4p*, 6-phosphogluconolactonase; *Gnd1p* et *Gnd2p*, 6-phosphogluconate déshydrogénase; *Rki1p*, Ribose-5-phosphate cétole-isomérase; *Rpe1p*, D-ribulose-5-phosphate 3-épimérase; *Tkl1p* et *Tkl2p*, Transcétole; *Tal1p*, Transaldolase.

acides aminés aromatiques (la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane). Il est également utilisé dans la synthèse des folates impliqués dans la synthèse de la méthionine.

Le flux à travers la VPP doit être ajusté en fonction des besoins de la cellule en NADPH, ATP et précurseurs métaboliques R5P et E4P. En conséquence, la répartition des carbones entre la glycolyse et la VPP est fortement régulée.

Les faibles valeurs de Michaelis-Menten de Zwflp sont insuffisantes ($K_m = 0.015$) pour que le flux à travers la VPP puisse augmenter sans un contrôle métabolique ou génétique (Levy, 1979). Le premier niveau de contrôle est de type allostérique. Le NADPH exerce une inhibition de type compétitif sur les enzymes NADP^+ -dépendantes, Zwflp et Gndp (Llobell et al., 1988; Vaseghi et al., 1999). D'autre part, le Mg^{2+} ATP inhibe de façon non compétitive et compétitive l'activité de Zwflp et de Gndp, respectivement (Kato et al., 1979; Vaseghi et al., 1999). Ainsi, l'activité de la VPP est augmentée en réponse à une diminution de la teneur intracellulaire en ATP provoquée par une augmentation du flux glycolytique.

Le **Tableau 7** liste les facteurs de transcription dont le rôle de régulateur direct d'un ou plusieurs gènes de la VPP a été décrit dans la littérature et qui sont répertoriés dans la base de données Yeastract (Teixeira et al., 2006). Gcn4p est impliqué dans l'activation des voies de synthèses des acides aminés et régule également *SOL3*. Leu3p active l'expression des gènes de la voie de synthèse de la leucine (*LEU9*, *LEU1* et *BAT2*) et de la proline (*PRO1* et *PRO2*) et de *ZcWFI*. Met4p active les gènes de la voie de synthèse de la méthionine (*MET14*, *MET16*, *MET10*, *MET17*, *MET2*) et régule les gènes *GND1* et *GND2*. Plusieurs facteurs de transcription (Aft4p, Aft2p, Skn7p, Sko1p, Yap1p, Yap5p et Yap6p) impliqués dans la réponse au stress oxydatif régulent également un ou plusieurs gènes de la VPP. En particulier, Yap1p régule l'expression de certains gènes de stress antioxydant, comme *TRX2* et *TRR1* codant respectivement la thioredoxine et la thioredoxine réductase et contrôle également *ZWFI*, *TAL1* (Lee, et al. 1999; Liu, et al. 2005) et *GND1* (Salin, et al., 2008) (**Figure 9**). Ce facteur de transcription est également impliqué dans la régulation de certains gènes du métabolisme des acides aminés (*GLT1*, *RPN4*, *UGA3*, *LYS20*, *AAD4*), et l'enzyme 3-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate (PAPS). D'autre part, des mutants délétés pour un ou plusieurs gènes de la VPP (*ZWFI*, *GND1*, *RPE1* et *TKL1*) sont sensibles à divers agent oxydants (furfural, 5-hydroxyméthylfurfural, peroxyde d'hydrogène H_2O_2) (Thorpe et al., 2004; Gorsich, et al. 2006; Juhnke et al., 1996). Ces données illustrent le lien particulier de la

TF	ZWF1	GND1	GND2	SOL3	SOL4	TKL1	TKL2	TAL1
Stress oxydatif								
Aft1p	x							
Aft2p	x							
Skn7p	x				x			
Sko1p	x		x		x		x	
Yap1p	x	x						x
Yap5p			x		x	x	x	
Yap6p	x		x		x		x	
Multiple stress (i.e. résistance aux drogues)								
Cad1p			x		x		x	
Cin5p	x		x		x			
Msn4p	x							
Pdr1p	x							
Synthèses acides aminés								
Gcn4p				x				
Leu3p	x							
Met4p		x	x					
Stb5p	x	x	x	x		x		x

Tableau 7 : Principaux facteurs de transcription qui régulent les gènes de la VPP

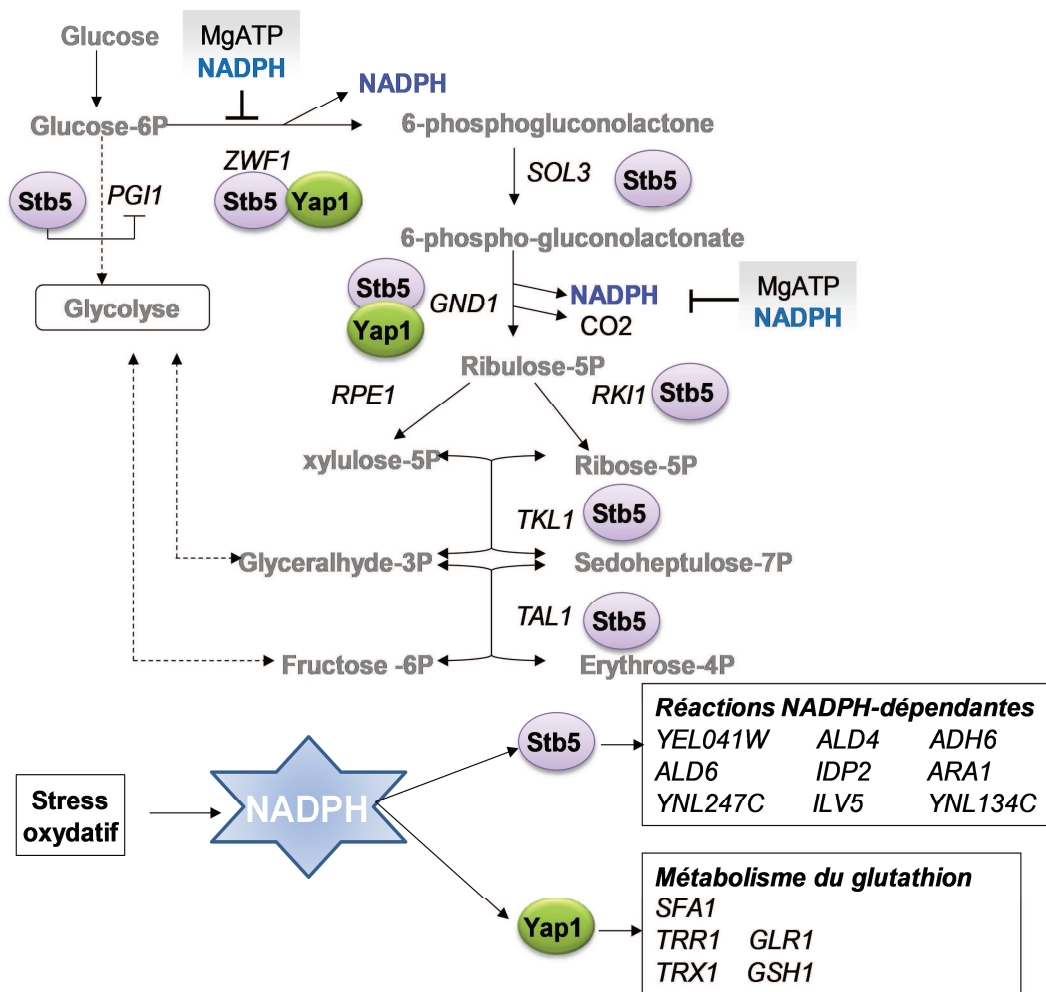


Figure 9 : Contrôle génétique et enzymatique de la VPP

Référence	Contribution ¹³ C % VPP	qVPP	q +NADPH _{VPP}	q -NADPH _{Biomasse}	% NADPH anabolique couvert par la VPP	batch/ chemostat	Souche
Anaérobie							
Cadière et al., 2011	11.0	3.5	6.9	3.3	207	batch	EC1118
Frick and Wittman, 2005	15.1	1.2	2.5	4.8	52	chemostat	ATCC32167
Respiro-fermentaire							
Blank et al., 2005	11.0	1.8	3.7	2.0	188	batch	CENPK
Gombert et al., 2001	16.2	2.6	5.1	2.7	192	batch	CENPK
Christen et al., 2010	9.2	1.5	2.9	3.5	83	batch	
Aérobie							
Christensen et al., 2002	42.0	0.4	0.8	0.8	110	chemostat	CENPK
Frick and Wittman, 2005	54.7	0.9	1.7	1.5	113	chemostat	ATCC32167

q= flux exprimé en mmol/gDW/h

Tableau 8 : Contribution de la VPP à la production de NADPH

VPP avec la réponse au stress oxydatif et plus généralement témoignent d'une gestion coordonnée par contrôle génétique des voies de production et de consommations du NADPH.

Récemment, le facteur de transcription Stb5p a été identifié comme un régulateur clé du métabolisme du NADPH en réponse à un stress oxydatif. Par des études de ChIP-chip, ces auteurs ont montré qu'en présence de H₂O₂ ou de diamine, Stb5 régule positivement l'expression de *ZWF1*, *SOL3*, *GND1*, *GND2*, *RKII* et *TKL1* (**Tableau 7**) ainsi que d'autres gènes du métabolisme NADPH (*ALD6*, *ARA1*, *YEL041W*, *YNL274C*, *ADH6*, *ILV5*, *YNL134C* et *IDP2*) (Larochelle, et al. 2006) (**Figure 9**). De plus Stb5p réprime *PGII* codant la phosphoglucose isomérase, située au carrefour de la glycolyse et de la VPP (**Figure 9**), permettant ainsi de rediriger de façon efficace le flux de carbone vers la VPP, afin de produire du NADPH.

En absence de stress oxydatif, Stb5p joue un rôle dans le maintien d'un flux basal de la VPP afin de produire le NADPH et les précurseurs métaboliques. Ainsi, un mutant *stb5Δ* présente une concentration intracellulaire réduite en NADPH et est auxotrophe à la méthionine (de même qu'un mutant *zwf1Δ*) ainsi qu'aux nucléotides pyrimidines (Cadière et al., 2010). La surexpression de *STB5* permet d'augmenter le flux à travers la VPP, et entraîne une incapacité de croissance sur glucose similaire au phénotype du mutant *pgi1Δ* (Cadière et al., 2010).

Le flux à travers la VPP doit être ajusté en fonction de la demande en NADPH et en précurseurs pour les biosynthèses imposée par les conditions environnementales. Le flux à travers cette voie peut être estimé par analyse de flux à partir de glucose marqué (¹³C flux).

Différentes études ont montré que le flux à travers la VPP varie entre 1.5 et 54.7 % du flux d'entrée de carbone, en fonction de la disponibilité en oxygène (aérobie ou anaérobie), des quantités de glucose (limitantes ou non) et du mode de culture (chemostat ou batch). En conditions respiratoires en chemostat ($D = 0.15 \text{ h}^{-1}$), le flux de la VPP est maximal et peut atteindre 54.7 % (Frick and Wittmann, 2005). Dans les conditions de cette étude, le flux de NADPH produit par la VPP est de l'ordre $0.8 \text{ à } 1.7 \text{ mmol.gDW}^{-1}$ et couvre l'ensemble des besoins anaboliques en NADPH (Christensen et al., 2002; Frick and Wittmann, 2005) .

En conditions respiro-fermentaires et en anaérobiose, le flux à travers la VPP diminue fortement. Dans ces conditions, 11% à 15% des carbones empruntent cette voie (Blank et al.,

2005). De manière étonnante, selon les études, la VPP produit jusqu'à 2 fois de NADPH que les besoins en NADPH pour l'anabolisme (Christen and Sauer, 2011; Cadière et al., 2011; Frick and Witmann, 2005) (**Tableau 8**). Si plusieurs facteurs peuvent contribuer à l'imprécision de ces données (détermination expérimentale ou non de la composition de biomasse, conditions expérimentales variables, différentes souches de levure), il faut noter que les approches ^{13}C -flux utilisées, qui reposent sur l'utilisation de modèles basés sur la stœchiométrie du carbone uniquement, ne permettent pas de prédire correctement l'équilibre de la balance $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$. De ce fait, la contribution des voies impliquées dans l'homéostasie du NADPH reste encore à élucider.

Chez la levure aucune transhydrogénase n'a été identifiée (Bruinenberg et al., 1983). Cependant l'estimation d'une production excessive de NADPH suggère l'existence de mécanismes permettant d'équilibrer le ratio $\text{NADH}/\text{NADP}^+$, tel que des cycles de réactions couplées que nous détaillerons dans le paragraphe §II-5.3 (Bakker et al., 2001).

II-4.1.2 Production d'acétate par l'acétaldéhyde déshydrogénase

La deuxième voie de formation du NADPH est la voie acétate. Cette voie met en jeu les activités pyruvate décarboxylase, et acétaldéhyde déshydrogénase. Associées avec l'acétyl-CoA synthétase, ces enzymes forment le PDH-bypass, seule source d'acétyl-CoA cytoplasmique, nécessaire à la synthèse des acides gras et des stérols (Flikweert et al., 1999; Berg and Steensma, 1995). Ainsi, la synthèse d'acétate cytoplasmique est essentielle à la survie de *S. cerevisiae*.

Parmi les 5 isoformes de l'acétaldéhyde déshydrogénase, l'isoforme NADP^+ -dépendante Ald6p joue un rôle majeur dans la production d'acétate : la délétion de *ALD6* conduit à une diminution de 40 % de la production d'acétate en condition de fermentation (YPD, 5 % glucose) (Remize et al., 2000), et est compensée par augmentation de l'expression de *ALD4*. Cette enzyme est également impliquée dans la résistance au stress oxydatif (Minard and McAlister-Heen, 2005), ce qui confirme son rôle clé dans la production de NADPH.

La double délétion *zwf1Δald6Δ* entraîne une incapacité de la souche à croître sur glucose (Grabowska and Chelstowska, 2003), ce qui indique qu'Ald6p est la deuxième source majeure de NADPH après la VPP. Ald6p est également impliquée dans la formation du NADPH en

réponse à un stress oxydatif (3 mM H₂O₂) (Minard and McAlister-Heen, 2005). Le flux à travers la voie acétate a été évalué par des approches d'analyse ¹³C. En conditions anaérobies, Ald6p couvre entre 8 et 19 % des besoins anaboliques en NADPH (Cadière et al., 2011; Frick and Wittmann, 2005) tandis qu'en condition respiro-fermentaire la contribution de cette voie peut atteindre 39 % (Gombert et al., 2001).

II-4.1.3 Isocitrates déshydrogénases : Idp1p et Idp2p

L'isocitrate déshydrogénase, qui catalyse la conversion de l'isocitrate en α -cétoglutarate est une source potentielle de NADPH. En plus de l'isocitrate deshydrogénase mitochondriale NAD⁺-dépendante Idhp, il existe 3 isocitrates déshydrogénases NADP⁺-dépendantes codées par les gènes *IDP1*, *IDP2*, *IDP3*, localisées respectivement dans la mitochondrie, le cytoplasme et les peroxisomes (Cupp and McAlister-Henn, 1991 ; Haselbeck and McAlister-Henn, 1991) (**Annexe 1** et **Annexe 2**). Idp2 n'est active qu'en présence d'une source non fermentescible (Minard and McAlister-Henn, 2005; Loftus et al., 1994; Grabowska and Chelstowska, 2003).

Par conséquent, en conditions de croissance sur glucose Idp2p ne peut être considérée comme une source de NADPH cytosolique.

II-4.1.4 Synthèse du NADPH dans la mitochondrie

Dans la mitochondrie, l'isocitrate déshydrogénase NADP⁺-dépendante Idp1p, l'enzyme malique Mae1p et les acétaldéhydes déshydrogénases Ald4p et Ald5p sont les réactions majoritaires de formation du NADPH. La contribution de ces différentes voies dépend des conditions environnementales et reste difficile à quantifier.

II-4.1.4.1 Enzyme malique

L'enzyme malique codée par le gène *MAE1* est une enzyme mitochondriale, NADP⁺-dépendante qui converti le malate en pyruvate et représente donc une source potentielle de NADPH mitochondrial (**Annexe 2**). En conditions anaérobies, l'expression de *MAE1* est augmentée de 3 fois par rapport aux conditions aérobies (Boles et al., 1998). Frick et

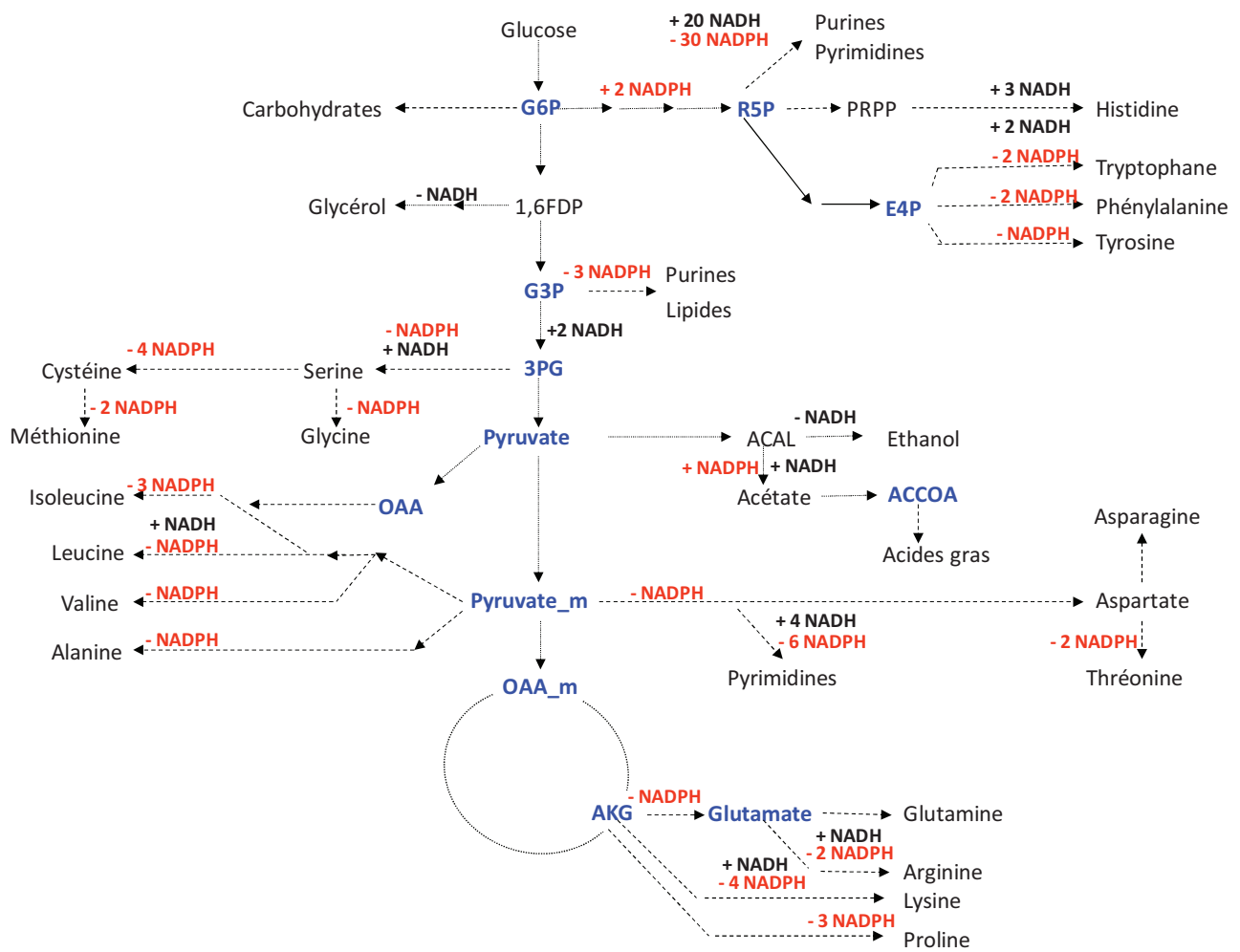


Figure 10 : Utilisation des cofacteurs pour la synthèse de la biomasse

Wittmann (2005) ont montré par une approche de ^{13}C flux que le flux à travers Mae1p est augmenté presque linéairement en fonction du taux de croissance et est maximal en conditions de fermentation. Un mutant délété pour *MAE1* ne présente pas de phénotype particulier et le rôle de cette enzyme reste mal compris aujourd'hui. Un rôle dans la production de pyruvate mitochondrial et de NADPH mitochondrial a été proposé (Maurino et al., 2009; Fiaux et al., 2003; Maaheimo et al., 2001; Boles et al., 1998). Cette enzyme peut également être impliquée dans l'échange de cofacteurs (§II-5.3).

II-4.1.4.2 Isocitrate déshydrogénase NADP⁺-dépendante : Idp1p

Idp1p est l'isoforme mitochondriale NADP⁺-dépendante de l'isocitrate déshydrogénase. Sur glucose, l'isoenzyme Idp1p représente 40 % de l'activité de l'isocitrate déshydrogénase mesurée *in vitro* (McCammon and McAlister-Henn, 2003). Cependant, cette enzyme, peut compenser celle de l'isocitrate déshydrogénase NAD⁺-dépendante, dans une souche où *IDH1* est délété (Haselbeck and McAlister-Henn, 1993). L'expression du gène *IDP1* est constitutive (Haselbeck and McAlister-Henn, 1991). Sa délétion n'entraîne aucun défaut de croissance quelle que soit la nature de la source de carbone et en présence de stress oxydatif (Minard et al., 1998).

II-4.1.4.3 Acétaldéhydes déshydrogénases mitochondriales NAD(P)⁺-dépendantes

Les acétaldéhydes déshydrogénases NAD(P)-dépendantes Ald4p et NADP dépendante Ald5p peuvent contribuer à la production de NADPH mitochondrial. En fermentation, Ald4p, qui peut utiliser indifféremment le NAD ou le NADP contribue peu ou pas du tout selon la souche de levure à la production d'acétate, mais est capable de compenser la perte d'Ald6p. Par contre, la délétion du gène *ALD5* diminue de 20 % la production d'acétate en conditions fermentaires (Saint-Prix et al., 2004).

II-4.1.5 NADH/NAD⁺kinase

Une autre source de NADPH mitochondrial est la NAD⁺ kinase Pos5p. Cette enzyme joue un rôle essentiel en l'absence du gène *ALD4* dans la production du NADPH et la délétion de *POS5* conduit à plusieurs phénotypes dont la sensibilité au stress oxydatif (Outten and Culotta, 2003). De plus, récemment, il a été montré *in vitro* que la réaction NAD⁺ kinase

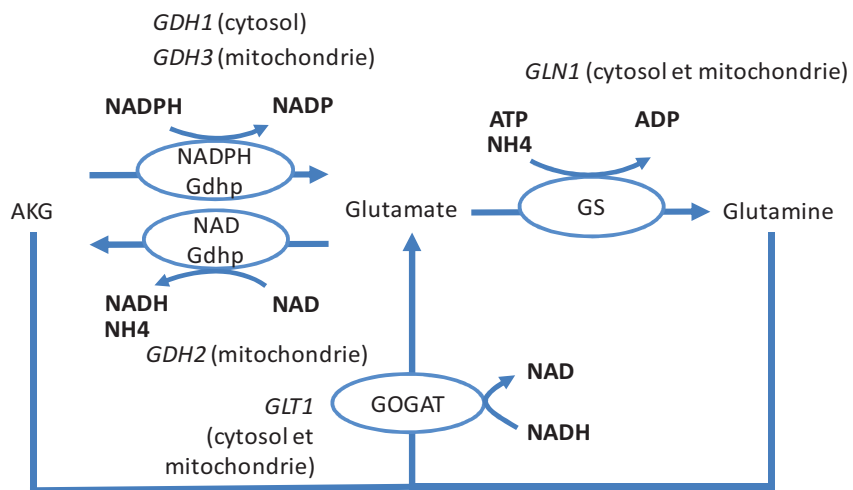


Figure 11 : Voie d'assimilation d'ammonium et de formation du glutamate et de la glutamine

catalysée par Pos5p couplée à Ald4p ou Ald5p (mais pas Idp1p ou Mae1p) pourrait contribuer de façon importante à la production de NADPH mitochondrial lors d'un stress oxydatif (2 mM H₂O₂) (Miyagi et al., 2009).

II-4.2 Consommation du NADPH

Le NADPH est le cofacteur essentiel des réactions anaboliques. Il est utilisé dans la biosynthèse des acides aminés, des bases purines et pyrimidines et des lipides (**Figure 10**). De plus, certains acides aminés peuvent être convertis en alcools supérieurs et en ester d'acides gras (§II-3.2). La formation de ces composés doit être prise en compte lors des bilans de production et de consommation de NADPH.

II-4.2.1 Synthèse des acides aminés

La synthèse des acides aminés consomme la majorité du NADPH nécessaire à la formation de la biomasse. Les équations bilans des voies de synthèse des acides aminés seront détaillées dans le **chapitre I, Tableau 14**. Le NADPH mitochondrial est utilisé pour la synthèse de 4 acides aminés (arginine, leucine, isoleucine et valine). Une large part du NADPH cytoplasmique (51 %) est consommé lors de la synthèse de glutamate (Nissen et al., 1997). Cet acide aminé est le donneur préférentiel du groupement amine pour 8 acides aminés à partir des précurseurs céto-acides. Deux glutamates déshydrogénases NADP⁺-dépendantes codées par *GDH1* et *GDH3* et localisées respectivement dans le cytoplasme et la mitochondrie, catalysent la synthèse de glutamate à partir de l'ammonium et de l' α -cétoglutarate (**Figure 11, Annexe 1, Annexe 2**). Le gène *GDH1* est fortement exprimé quelle que soit la source de carbone utilisée tandis que *GDH3* est réprimé par le glucose (DeLuna et al., 2001). Les GDH font parties de la voie d'assimilation de l'ammonium comprenant la glutamine synthétase (GS) codée par le gène *GLN1* et la glutamate synthase (GOGAT) codée par le gène *GLT1* qui forment du glutamate à partir de l' α -cétoglutarate et de la glutamine (**Figure 11**).

La voie d'assimilation des sulfates est également une voie importante dans le métabolisme du NADPH; Cette voie conduit à la synthèse de méthionine, de cystéine, du glutathion et de la S-adenosylmethionine (principal donneur de méthyl aux précurseurs des

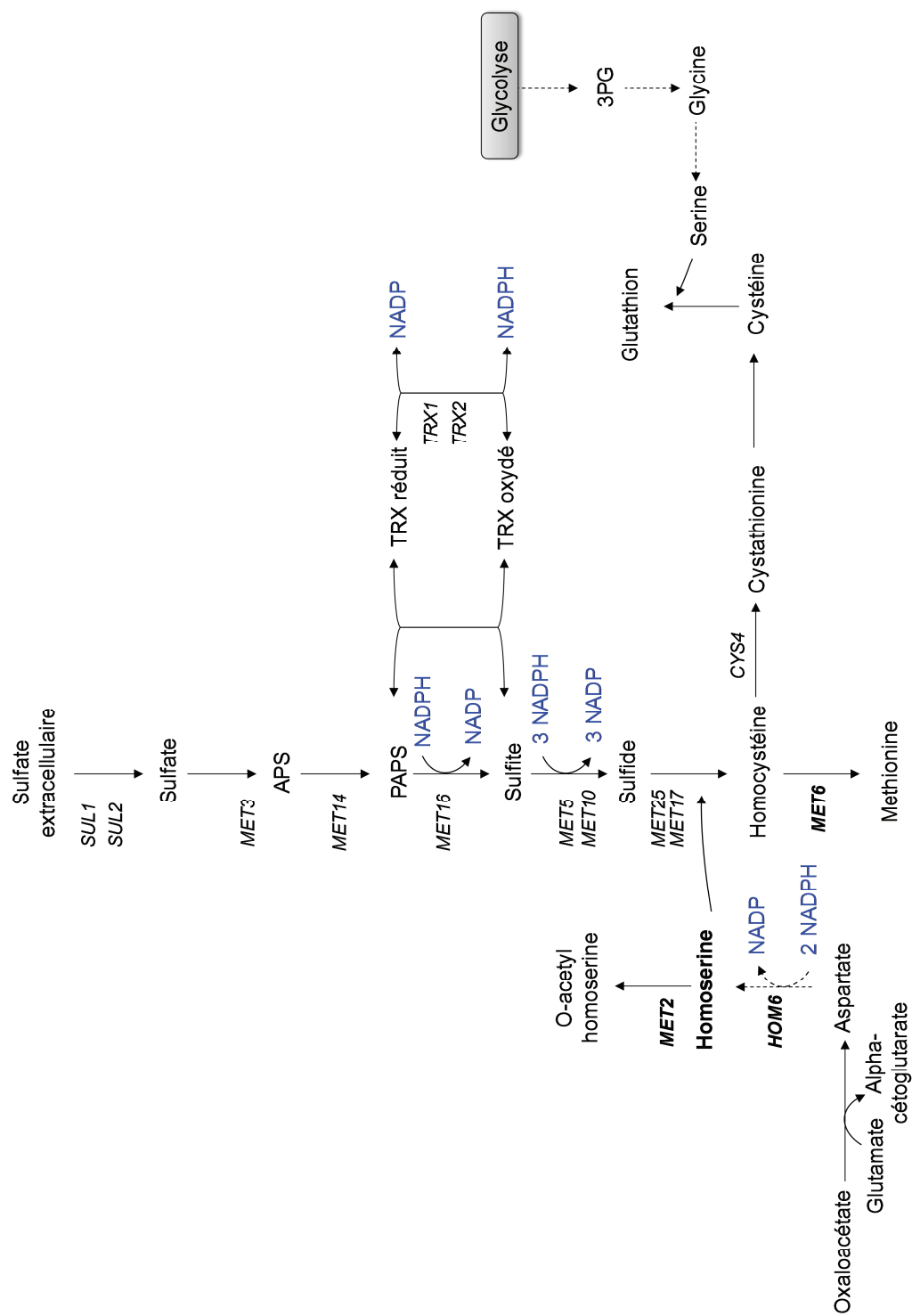


Figure 12 : Voie d'assimilation des sulfates et voie de synthèse de la méthionine

vitamines et des nucléotides modifiés) (**Figure 12**). La 3'-phosphoadenylsulfate reductase (PAPS réductase) et les sulfite réductases codées par les gènes *MET16*, *MET5* et *MET10* sont des réactions clés qui consomment du NADPH (**Figure 12**). La synthèse de l'homocystéine, qui est située au carrefour entre la voie de la méthionine et de la cystéine implique l'aspartique β semi-aldéhyde déshydrogénase (Hom2p) et l'homosérine déshydrogénase (Hom6p), toutes 2 NADPH dépendantes.

La synthèse de l'homosérine, précurseur de la cystéine et isoleucine, nécessite 4 molécules de NADPH et la synthèse de la méthionine à partir du glucose requière 7 molécules de NADPH. La voie d'assimilation des sulfates est donc sensible à la modification du pool NADPH comme illustré par le fait que le mutant *zwf1 Δ* , dépourvu d'activité glucose 6-phosphate déshydrogénase, source majeure de NADPH est auxotrophe pour la méthionine (Slekar et al., 1996).

II-4.2.2 Synthèse des acides gras et des nucléotides

Les équations bilans des voies de synthèse des nucléotides et des acides gras seront détaillées dans le **chapitre I, Tableau 14**. Ces composés sont produits en faible quantité, de l'ordre de 4 $\mu\text{mol.gDW}^{-1}$ pour les acides gras et l'ADN et 40 $\mu\text{mol.gDW}^{-1}$ pour l'ARN (Forster et al., 2003). De ce fait, la consommation de NADPH associée est faible et ne représente qu'environ 6 % du NADPH consommé par la biomasse.

II-4.2.3 Rôle du NADPH dans la protection contre le stress oxydatif

Le NADPH joue un rôle important dans la réponse cellulaire au stress oxydatif (Minard and McAlister-Henn, 2005). En présence d'oxygène, des espèces réactives à l'oxygène ["reactive oxygen species" (ROS)] sont produites, comme le peroxyde d'hydrogène, pouvant endommager l'ADN, les lipides ou les protéines. La levure possède plusieurs mécanismes de défense contre les ROS, par exemple la glutathion peroxidase ou la thioredoxine peroxidase. Ces mécanismes utilisent des molécules comme le glutathion (GSH) et la thioredoxine (TRX) qui servent soit eux-mêmes de réducteurs soit de cofacteurs pour les enzymes anti-oxydantes (**Figure 13**) (Jamieson, 1998; Carmel-Harel and Storz, 2000; Weissbach and Brot, 2009). Deux enzymes, la glutathion réductase et la thioredoxine réductase jouent un rôle

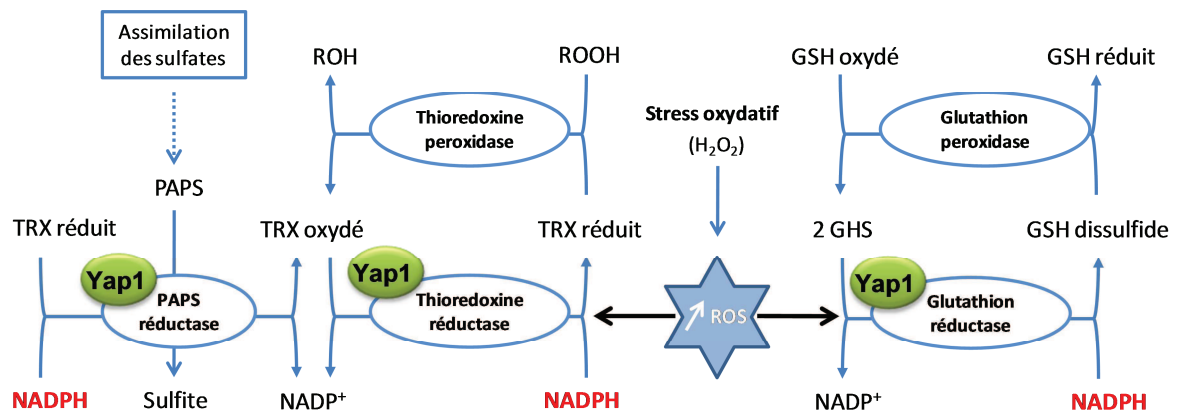


Figure 13 : Mécanismes de réponse au stress oxydatif et rôle du NADPH dans la régénération des formes réduites du glutathion et de la thiorédoxine.

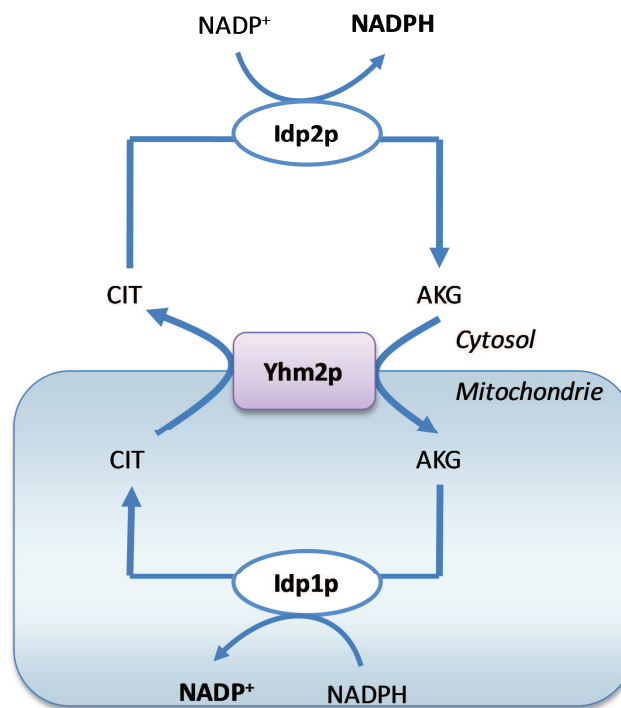


Figure 14 : Transporteur YHM2, permettant d'échanger le NADPH mitochondrial et cytosolique

mécanismes de défenses anti-oxydants, car elles permettent la régénération des formes réduites de GSH ou de TRX (Grant, 2001 ; Jamieson, 1998) (**Figure 13**). Ces deux enzymes utilisent le NADPH comme cofacteur.

II-4.3 Systèmes d'échange du NADPH entre le cytoplasme et la mitochondrie

Alors que différentes possibilités d'échange du NADH entre les compartiments ont été décrites (§II-3.3), les possibilités d'échange du NADPH entre les compartiments sont moins connues. Récemment, un transporteur mitochondrial codé par *YHM2* permettant le transport en antiport du citrate et de l' α -cétoglutarate a été identifié (Castegna et al., 2010). Le transport du citrate et de l' α -cétoglutarate catalysé par le transporteur Yhm2p, couplé aux isoformes isocitrates déshydrogénases NADP⁺ dépendante Idp2p et Idp1p peut être un cycle potentiel d'échange du NADPH mitochondrial en NADPH cytosolique (**Figure 15**) qui a été décrit par Castegna et al. (2010).

En présence d'un stress oxydatif sur un milieu 2 % glucose et 2 % acétate, le mutant *yhm2Δ* présente un défaut de croissance équivalent à celui d'un mutant *zwf1Δ*. Il présente également un ratio NADPH/NADP⁺ cytosolique diminué et un ratio NADPH/NADP⁺ mitochondrial augmenté comparé à une souche sauvage (Castegna et al., 2010). Cette étude montre que le rôle de ce transporteur est l'échange de NADPH mitochondrial avec du NADPH cytosolique (**Figure 14**). Il est à noter qu'en conditions de fermentation l'activation de ce transporteur n'a pas été démontrée. Cette navette d'échange de NADPH entre les 2 compartiments inclut notamment Idp1p et Idp2p, cette dernière n'étant pas active en fermentation (§II-4.1.3).

II-5 Connections entre les couples NAD(H) et NADP(H)

Chez différents organismes, bactéries, protozoaires ou cellules humaines (Fuhrer and Sauer, 2009; Hatefi and Galante, 1977), des transhydrogénases permettent l'interconversion entre les deux dinucléotides nicotamide NADH et NADPH : $\text{NADH} + \text{NADP}^+ \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{NADPH}$. Cette réaction augmente le degré de liberté et libère des contraintes pour l'oxydation et la production de ces cofacteurs.

Contrairement à ces organismes, *S. cerevisiae* ne possède pas de transhydrogénase (Bruinenberg et al., 1983; Bakker et al., 2001). Par conséquent, la contrainte des cofacteurs sur le réseau stœchiométrique pour équilibrer les balances redox est forte. L'absence de transhydrogénase implique que la demande en NADPH doit être couverte et équilibrée par les réactions de formation du NADPH présentées précédemment (§II-4.1). Cependant, *S. cerevisiae* dispose d'autres réactions (NADH kinases, cycles redox) pouvant réaliser potentiellement l'interconversion du NAD(H) en NADP(H), mimant ainsi des réactions de transhydrogénases. Ces réactions sont décrites dans cette section.

II-5.1 Transhydrogénases chez différents organismes

Furher et Sauer (2009) ont déduit, par des expériences ^{13}C flux en batch 0,3 % glucose, le flux de production du NADPH à travers la VPP et l'ont comparé à la demande anabolique afin de déterminer si la balance NADPH/NADP⁺ est équilibrée. A l'exception de *Pseudomonas fluorescens*, un surplus de NADPH/NADP⁺ est observé chez plusieurs espèces bactériennes (*Bacillus subtilis*, *Agrobacterium tumefaciens*...) et chez certaines espèces de levures, par exemple *Pichia stipitis* (Fiaux et al., 2003). Parmi ces espèces étudiées, *Escherichia coli* est la seule espèce qui ne produit pas suffisamment de NADPH pour couvrir la totalité du NADPH nécessaire à la demande anabolique. En effet, il a été montré qu'en plus des transhydrogénases présents chez les autres espèces bactériennes, *E. coli*, possède une de transhydrogénase catalysée par UdhA qui réoxyde du NADPH (Sauer et al., 2003).

II-5.2 NADH/NAD⁺ kinases

La levure *S. cerevisiae* possède différentes kinases potentiellement impliquées dans le contrôle de l'équilibre d'oxydoréduction : les gènes *UTR1*, *YEF1* et *POS5* codent pour des NAD(H) kinases assurant la conversion du NAD(H) en NADP(H).

Dans le cytoplasme, le NADP⁺ peut être échangé par du NAD⁺ par l'activité NAD⁺ kinase d'Utr1p ou de Yef1p (Kawai et al., 2001; Shi et al., 2005) (Tableau 9). La délétion du gène *UTR1* entraîne un défaut de croissance en fermentation ce qui suggère une contribution non négligeable de cette enzyme dans la production de NADP⁺ cytosolique (Bieganowski et al., 2006). L'activité NAD⁺ kinase de Yef1p est négligeable par rapport à Utr1p (Bieganowski

et al., 2006), mais peut se substituer à l'activité de Utr1p quand le gène *YEF1* est surexprimé. Par contre l'activité NADH kinase de Utr1p et de Yef1p est négligeable, ces NADH kinases ne participent pas à la formation de NADPH dans le cytosol (Shi et al., 2005).

Dans la mitochondrie, Pos5p catalyse la conversion ATP-dépendante du NADH en NADPH par une activité NADH kinase (**Tableau 9**) (Outten and Culotta 2003). La réaction NADH kinase Pos5p semble être une source potentielle de NADPH mitochondrial dans la formation de NADPH mitochondrial de cette NADH kinase (Miyagi et al., 2009). Pos5p a également une activité NAD^+ kinase, plus faible cependant que l'activité NADH kinase (Miyagi et al., 2009). Il a été montré en présence de H_2O_2 que le couplage d'Ald4p avec Pos5p NAD^+ kinase peut produire du NADPH (Miyagi et al., 2009).

II-5.3 Systèmes "transhydrogénase-like"

Chez *S. cerevisiae*, il existe plusieurs systèmes couplant des déshydrogénases cytosoliques ou mitochondriales permettant l'échange du NAD(H) en NADP(H). Ces systèmes miment des réactions transhydrogénase :

(i) Le couplage de l'enzyme malique (Mae1p) et de Mdh1p ou de Mdh2p permet d'échanger du NADH mitochondrial ou cytosolique, respectivement, en NADPH mitochondrial au détriment d'un ATP consommé (Boles et al., 1998; Moreira dos Santos et al., 2004) (**Figure 15**). Ce système fait appel au transport de l'oxaloacétate et du malate à travers la membrane mitochondriale *via* les transporteurs Oac1p et Dic1p. Récemment la délocalisation de l'enzyme malique Mae1p dans le cytosol, dans une souche délétée pour les gènes *PYC1*, *PYC2* et *PDC2* a montré la capacité de Mae1p à produire du pyruvate (Zelle et al., 2011). Cependant le rôle de ce cycle n'est à ce jour pas encore clarifié.

(ii) La voie de synthèse du glycérol, couplée à la synthèse de dihydroxyacétone (DHA) permet d'échanger dans le cytosol du NADH avec du NADPH (**Tableau 9**). Le glycérol, formé à partir de DHAP *via* la glycérol 3-déshydrogénase NADH-dépendante et la glycérol 3-phosphatase (cf. §II.3.2) peut être excrété ou être converti en DHA par une glycérol déshydrogénase NADP^+ -dépendante. Quatre gènes *ARA1*, *GCY1*, *GRE3* et *YPR1* ont été décrits comme contribuant à cette activité (**Figure 16**) (Oechsner et al., 1988; Kuhn et al.,

NADH/NAD kinase		
Pos5p NADH kinase	NADH _m	=> NADPH _m
Pos5p NAD kinase	NAD ⁺ _m	=> NADP ⁺ _m
Yef1 ou Utr1 NADH kinase	NADH _c	=> NADPH _c
Yef1 ou Utr1 NAD kinase	NAD ⁺ _c	=> NADP ⁺ _c
Transhydrogénase like		
Cycle Pos5p/Ald4p	NADP ⁺ _m + NAD ⁺ _m	=> NADPH _m
Cycle enzyme malique Pyc1/2p/Mdh2p/Mae1p	NADP ⁺ _m + NADH _c	=> NADPH _m + NAD ⁺ _c
Cycle enzyme malique Pyc1/2p/Mdh1p/Mae1p	NADP ⁺ _m + NADH _m	=> NADPH _m + NAD ⁺ _m
Cycle futile Glycérol/DHAP	NADP ⁺ _c + NADH _c	=> NADPH _c + NAD ⁺ _c
Glutamates déshydrogénases (Gdh1p/Gdh2p)	NADPH _c + NAD ⁺ _m	=> NADH _m + NADP ⁺ _c
Glutamates déshydrogénases (Gdh3p/Gdh2p)	NADPH _m + NAD ⁺ _m	=> NADH _m + NADP ⁺ _m

Tableau 9 : Systèmes d'échange entre les cofacteurs NADP(H) et NAD(H) chez *S. cerevisiae*

2004). Le DHAP est ensuite produit à partir du DHA par une DHA kinase, codée par les gènes *DAK1* et *DAK2* (Figure 16).

Le DHA est toxique pour la cellule, et l'activité de la DHA kinase est essentielle pour détoxifier la cellule. En effet, le double mutant (*dak1Δdak2Δ*) est très sensible au DHA (Molin et al., 2003). Le rôle de ce cycle et sa contribution en fermentation ne sont pas clairement établis. La détoxification de DHA joue un rôle vital dans la réponse à divers stress. L'activité de la DHA kinase est modulée dans diverses conditions de stress : thermique (Boy-Marcotte et al., 1999), osmotique (Gash et al., 2000), oxydatif (Godon et al., 1998), éthanol (Ma et Liu, 2010), et en présence de cadmium (Vido et al., 2001). La DHA kinase est également surproduite dans les milieux salins (Norbeck and Blomberg, 1997). Ce cycle pourrait jouer différents rôles en situation de stress : contrôle de l'accumulation de glycérol, échange des cofacteurs (cycle transhydrogénase) ou consommation de l'ATP (ce cycle constituant un cycle futile, consommant de l'ATP) (Blomberg, 2000).

(iii) le couplage de la glutamate déshydrogénase NADPH-dépendante cytosolique ou mitochondriale codées, respectivement, par *GDH1* et *GDH3* avec la glutamate déshydrogénase NAD^+ -dépendante mitochondriale (*Gdh2p*) (§II-4.2.1) permet d'échanger du NADP^+ cytosolique ou mitochondrial en NADH mitochondrial (Tableau 9, Figure 18). Le fonctionnement de ce cycle n'a pas été établi. Très récemment, il a été montré que la surexpression des gènes *GDH1* et *GDH2* en condition de fermentation augmente de 15 % la production de glycérol (Vargas et al., 2011).

II-6 Perturbations de l'équilibre redox et maintien de l'homéostasie

Différents travaux ont été conduits ces dernières années afin d'analyser la réponse métabolique de la levure à une perturbation de l'équilibre redox. Ces travaux ont plusieurs objectifs : (i) mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'homéostasie redox, (ii) dans un contexte plus appliqué, réorienter le métabolisme levurien vers des sous-produits d'intérêt.

Ces travaux sont basés sur l'étude de l'effet (i) de la délétion ou de la surexpression de gènes impliqués dans le métabolisme du NAD(P) (ii) de l'expression de gènes hétérologues modifiant la demande en cofacteurs.

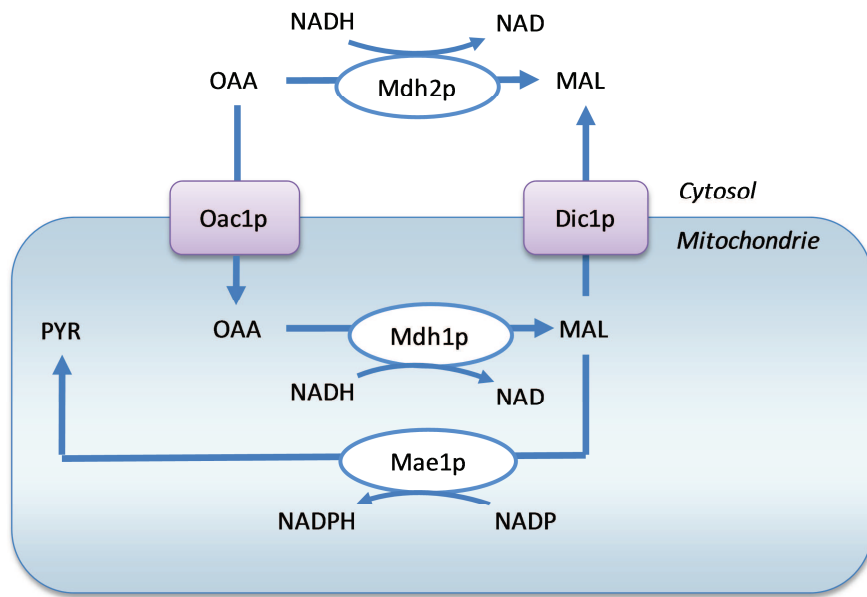


Figure 15 : Couplage entre l'enzyme malique et la malate déshydrogénase mitochondrial ou cytoplasmique

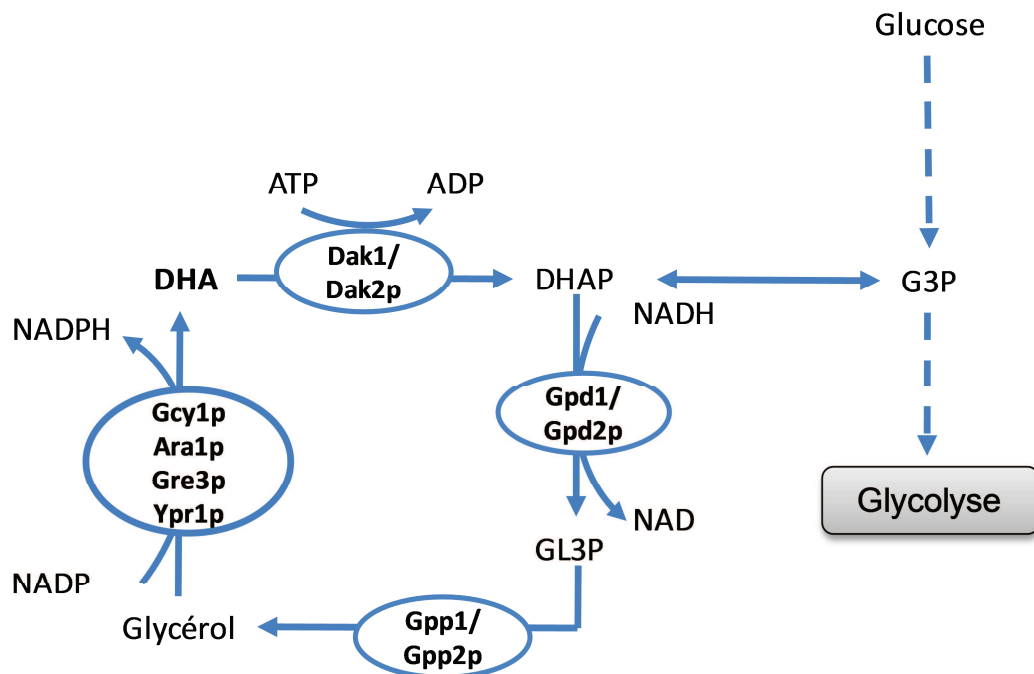


Figure 16 : Couplage du cycle glycérol-DHA

II-6.1 Perturbations du métabolisme NADH

Deux stratégies, conduisant à une augmentation de l'oxydation du NADH cytosolique ont été développées par Hou et collaborateurs : expression hétérologue d'une NADH oxydase de *Streptococcus pneumoniae* ("nox") et délocalisation et surexpression dans le cytoplasme de la NADH kinase mitochondriale Pos5p. Les conséquences de ces modifications génétiques ont été analysées au cours de cultures en conditions respiro-fermentaires (Hou et al., 2009). La diminution de NADH cytosolique entraîne une diminution de la production de glycérol et du flux d'entrée de glucose (Hou et al., 2009). Dès qu'un carbone est dirigé vers la voie glycérol, deux molécules d'ATP sont consommées. Pour compenser cette consommation d'énergie, le flux de carbone doit être augmenté à travers la glycolyse.

Ces observations sont en accord avec plusieurs études visant à diminuer le rendement en éthanol en réorientant le flux carboné vers d'autres métabolites. Ainsi, la surexpression de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase Gpd1p permet d'augmenter la production de glycérol au détriment de la production d'éthanol (Michnick et al., 1997). Une autre stratégie a reposé sur l'expression d'une NADH oxydase bactérienne (NoxE), qui diminue significativement la production de glycérol (Heux et al., 2006). Dans les 2 cas la diminution du NADH (et la déviation des carbones dans l'approche glycérol), permet de diminuer efficacement le rendement en éthanol, mais conduit également de façon indirecte à une augmentation de la production d'acétaldéhyde, d'acétate et d'acétoïne (Remize et al., 1999 ; Heux et al., 2006).

La limitation du flux au travers de l'alcool déshydrogénase NADH-dépendante Adh1p entraîne en effet une augmentation de la concentration en acétaldéhyde intracellulaire. L'acétaldéhyde étant toxique, la cellule redirige les flux vers la production d'acétate et d'acétoïne. Par ailleurs, la limitation en NADH ralentit la conversion de l'acétoïne en 2,3-butanediol, catalysée par la butanediol déshydrogénase NADH dépendante, résultant en une accumulation d'acétoïne (Cambon, et al, 2006).

Enfin, le pool en NADH mitochondrial a été diminué par expression d'une NADH oxydase (*Histoplasma capsulatum*, codée par *AOX1*) ou par surexpression de la NADH kinase mitochondriale (Hou et al., 2009). Ces modifications entraînent une baisse de la production aérobie d'éthanol. Dans des travaux antérieurs, cette équipe avait montré que la réduction de

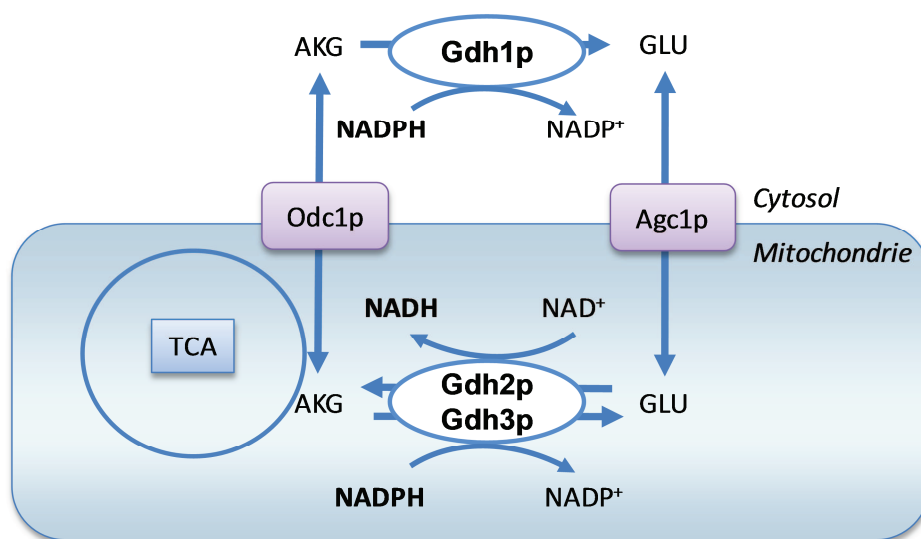


Figure 17 : Couplage des glutamates déshydrogénases (Gdh1p, Gdh3p, Gdh2p)

la production aérobie d'éthanol consécutive à l'expression d'une oxidase alternative était due à une augmentation de la capacité du TCA (Vemuri, et al, 2007).

Ces études soulignent le rôle très important de la compartimentation. De plus, la modification de la balance NADH/NAD^+ entraîne de nombreux effets indirects sur la formation de sous-produits, en particulier au nœud acétaldéhyde et du TCA. Ces résultats renforcent la nécessité d'aborder l'étude du métabolisme redox à l'échelle de la cellule.

II-6.2 Perturbations du métabolisme NADPH

Plusieurs études visant à étudier la réponse de la cellule à une perturbation de l'équilibre NADP/NADPH ont également été décrites. Le métabolisme NADPH a été en particulier étudié dans le contexte de souches génétiquement modifiées pour l'utilisation du xylose. Pour pallier au déséquilibre redox observé chez ces souches, des approches visant à régénérer le NADPH ont été mises en œuvre, telles que l'expression d'une glycéraldéhyde-3-phosphate NADP^+ -dépendante (Bro et al., 2006) ou l'expression à d'une xylose déshydrogénase NADP^+ -dépendante hétérologue (Matsushika et al., 2009).

D'autres études visent à perturber directement le ratio $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$. En réponse à un ajout de furfural, qui permet d'augmenter la consommation de NADPH, le flux à travers la VPP et dans une moindre mesure la production d'acétate sont augmentés (Heer et al., 2009). Dans une autre étude, des souches modifiées pour l'assimilation d'ammonium ont été construites dans le but d'augmenter la disponibilité en NADPH. Des souches délétées pour *GDH1* codant la glutamate déshydrogénase NADPH-dépendante et surproduisant Gdh2 (qui fonctionne dans le sens inverse, générant du NADH) ou *GLN1* et *GLT1* (système GS-GOGAT) (**Figure 11**) présentent une diminution de moitié du flux à travers la voie des pentoses phosphates lors de la croissance aérobie sur glucose (Moreira dos Santos et al., 2003).

Une autre étude a été basée sur la surexpression de l'enzyme malique dans la mitochondrie ou dans le cytosol, conduisant à une augmentation de la production de NADPH (Moreira dos Santos et al., 2004). Lors de cultures aérobies en chemostat, ces modifications entraînent une diminution du flux à travers la VPP et une augmentation du flux à travers le TCA, ainsi que des effets sur l'assimilation d'ammonium. L'activité des glutamate

déshydrogénases cytosolique et mitochondriale est augmentée, suggérant le fonctionnement du cycle glutamate déshydrogénase (§II-4.2.1), permettant la conversion de NADPH cytosolique en NADH mitochondrial (Boles et al., 1993). Cette étude pose en outre la question de savoir comment une augmentation de l'activité enzyme malique mitochondriale peut générer une augmentation du flux à travers la VPP cytosolique.

L'expression de la transhydrogénase d'*Azotobacter vinelandii* Sth chez *S. cerevisiae* a permis la conversion du NADPH en NADH dans le cytosol (Nissen et al., 2001). En réponse à cette modification, une diminution de la croissance de 49 % et une augmentation de la production du glycérol sont observées. La production d'acétate n'est pas modifiée, ce qui indique que la diminution du taux de croissance est suffisante pour économiser le NADPH. L'effet sur la croissance s'explique par la compétition pour le NADPH entre l'enzyme hétérologue Sth et Gdh1p pour l'utilisation du glutamate.

MATERIELS ET METHODES

I-Matériel biologique

I-1 Souches de levure

La levure utilisée dans cette étude est la souche *S. cerevisiae* haploïde 59A (*MAT a*). Cette souche dérive de la souche œnologique EC1118, dont le génome a été séquencé au laboratoire. Elle présente des capacités fermentaires comparables à celles des souches industrielles en conditions de fermentation œnologique et se manipule facilement d'un point de vue génétique.

I-2 Plasmides

Les plasmides utilisés dans ce travail sont listés dans le **Tableau MM1**.

I-3 Oligonucléotides

Les oligonucléotides utilisés dans ce travail ont été synthétisés par MWG Biotech et sont listés dans le **Tableau MM2**.

II- Milieux et conditions de culture

II-1 Composition des milieux de culture

Le milieu YEPD (Tableau MM 3) a été utilisé pour la conservation des souches (milieu solide) et la préparation des précultures. Ce milieu est autoclavé 30 min à 110°C immédiatement après préparation et conservé à température ambiante. Pour la préparation des milieux solides, 20 g/L d'agar sont ajoutés avant stérilisation. Pour l'ensemble des cultures réalisées au cours de ce travail, le milieu minimum 2x YNB (Tableau MM 3) a été utilisé. Ses caractéristiques principales sont une forte concentration en glucose (100 g/L), une teneur en azote de 1056 mg/L, un pH de 4.5. La présence de facteurs anaérobies dans ce milieu (Tableau MM 4) permet d'apporter aux levures de l'ergostérol et composés ne pouvant être synthétisés en absence d'oxygène. Ce milieu est conservé à – 20°C et pasteurisé sous vapeur fluente 10 min à 100°C avant utilisation. En fonction des besoins de l'étude, de l'acétoïne est ajoutée au milieu de culture, à partir d'une solution mère de 1,5 M (Sigma Aldrich). L'acétoïne étant un composé extrêmement volatile, la solution mère doit être préparée

Plasmides	Principales caractéristiques	Marqueur	Références
pUG6	lox-kanMX4-loxP	Résistance à la généticine	Güldener et al., 1996
pAG32	hphMX4	Résistance à l'hygromycine B	Goldstein and McCusker, 1999

Tableau MM 1 : Liste des plasmides utilisés

Souches	Génotype	Oligonucléotides	Référence
59A	--	5'CTTCTTTCTT AAAAAGTCTT AGTACGATTG ACCAAGTCAG TTCGTACGCT GCAGGTCGAC-3' 5'TACAAATGAGCCGCGAGGGGCCCCAAATATTA TTTTGTCA GCATAGGCCACTAGTGGATCTG-3'	INRA UMR 1083
59A Bdh-NADH	59A::kanMX4- <i>TDH3pBDH</i>	5'CTTCTTTCTT AAAAAGTCTT AGTACGATTG ACCAAGTCAG TTCGTACGCT GCAGGTCGAC-3' 5'TACAAATGAGCCGCGAGGGGCCCCAAATATTA TTTTGTCA GCATAGGCCACTAGTGGATCTG-3'	Cette étude
59A Bdh-NADPH	59A::kanMX4- <i>TDH3pBDH1</i> ^{221,222,223}	5'CTTCTTTCTT AAAAAGTCTT AGTACGATTG ACCAAGTCAG TTCGTACGCT GCAGGTCGAC-3' 5'TACAAATGAGCCGCGAGGGGCCCCAAATATTA TTTTGTCA GCATAGGCCACTAGTGGATCTG-3'	Cette étude
59A Bdh-NADPH _{gdh2}	59A Bdh-NADPH <i>gdh2</i> (-70,3298)::hph	5'TGATTGTCACGATCTCAACAAAACATACAA AACAAGGATAAGCTTGCCTCGTCCCCGCCG-3' 5'AAAACAATTTTATTGAAGCTCAAGCACTTGCCT CCGCTTCGTATCGAATCGACAGCAGTA-3'	Cette étude

Tableau MM 2 : Liste des souches utilisées et issues de ce travail

impérativement extemporanément et au froid, puis ajoutée au milieu de culture juste avant l'ensemencement des acides gras insaturés (essentiels pour maintenir l'intégrité des membranes cellulaires), ces composés ne pouvant être synthétisés en absence d'oxygène. Ce milieu est conservé à -20°C et pasteurisé sous vapeur fluente 10 min à 100°C avant utilisation.

En fonction des besoins de l'étude, de l'acétoïne est ajoutée au milieu de culture, à partir d'une solution mère de 1,5 M (Sigma Aldrich). L'acétoïne étant un composé extrêmement volatile, la solution mère doit être préparée impérativement extemporanément et au froid, puis ajoutée au milieu de culture juste avant l'ensemencement.

II-2 Conditions de cultures

Les précultures sont réalisées dans des fioles Erlenmeyer ou dans des tubes de 50 mL type Falcon[®] remplis au 1/5^{ème} de leur volume et agités 12 h à 200 tours/min, à 28°C . Les fermentations sont ensemencées à une DO de 0.05 à 600 nm à partir de ces précultures.

Le dégagement de CO_2 s'effectue au travers d'une cloche en verre contenant de l'eau stérile. Pour les fermenteurs de 1,2 L, une température isotherme de 28°C est maintenue à l'aide de lampes chauffantes et d'une sonde qui renseigne sur la température du milieu. La mesure du dégagement de CO_2 est réalisée par mesure automatique de la perte de poids des fermenteurs toutes les 20 min. Une corrélation linéaire entre la quantité de CO_2 dégagé et la quantité de sucre métabolisé permet le calcul des paramètres de la fermentation. La validité de cette technique pour suivre la cinétique fermentaire a été précédemment démontrée (Bely et al., 1990; El Haloui et al., 1988). Les nombreuses acquisitions concernant le dégagement de CO_2 , ainsi que la précision de la pesée (0.1 à 0.01 g), permettent de calculer la vitesse de production de CO_2 de façon très fine. Le système est contrôlé par une interface IN/OUT (National Instruments[®]) reliée à un ordinateur équipé d'un logiciel d'acquisition développé sous LabVIEW[®].

Les fermenteurs de 300 mL sont placés dans une pièce à 28°C et un suivi régulier (manuel) de la perte de poids permet de déterminer l'avancement de la fermentation.

(A)	
Milieu YEPD	Quantité
Extrait de levure	10 g
Peptone	20 g
Glucose	20 g
Eau distillée qsp	1 L

(B)	
Milieu 2x YNB	Quantité
Yeast Nitrogen Base sans acides aminés	13,4 g
Glucose	100 g
Facteurs anaérobies	250 µL
Eau distillée qsp	1 L

Tableau MM 3 : Milieux utilisés dans l'étude

Composition du milieu YEDP (A) et du milieu 2xYNB (B)

Facteurs anaérobies	Quantité
Ergostérol	1.5 g
Acide oléique	0.5 mL
Tween 80	50.0 mL
Ethanol qsp	100 mL

Tableau MM 4 : Solution mère des facteurs anaérobies

II-3 Mesure de la population cellulaire

II-3.1 Par la mesure de la densité optique

La concentration cellulaire d'une suspension de levure est déterminée par mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 600 nm (DO_{600nm}) (spectrophotomètre Ultrospec2000, Pharmacia Biotech®). Les prélèvements sont préalablement dilués de façon à rester dans la gamme linéaire de mesure de DO_{600nm} comprise entre 0,1 et 0,8.

II-3.2 Par comptage cellulaire

Le nombre et la taille des cellules sont évalués à l'aide d'un compteur électronique de particules (Beckman® Coulter, modèle ZB-2). Le principe repose sur des changements mesurables de résistance électrique entraînés par les particules non-conductrices en suspension dans un électrolyte (Isoton II). La zone de détection est composée par un orifice de 100 μm entre deux électrodes par lequel passe chaque particule. Le volume d'électrolyte déplacé par chaque particule est mesuré sous forme d'une impulsion de voltage, la hauteur de cette impulsion étant proportionnelle au volume de la particule. Les prélèvements sont préalablement dilués de façon à rester dans la gamme linéaire se situant entre 20.10^3 et 100.10^3 cellules/mL. Les agrégats de cellules sont séparés préalablement par sonication dans un générateur d'ultra-sons (Branson Sonifier® Modèle 250).

II-3.3 Détermination de la matière sèche

Le poids sec (Q_{MS}) est déterminé en filtrant 10 mL de culture sur un filtre de nitrocellulose de porosité 0,45 μm (Millipore®). Le filtre est ensuite rincé 2 fois avec 50 mL d'eau distillée et séché dans un four à 110°C pendant 48 heures (poids constant).

II-4 Tests en "goutte"

Des cultures liquides sontensemencées à une DO_{600nm} de 0.2 à partir de précultures effectuées sur une nuit dans des tubes Falcon® de 15 mL contenant 5 mL de YEPD sous agitation à 200 tours/min à 28 °C. Lorsque la DO_{600nm} de la culture est comprise entre 0,5 à 1, les cellules sont prélevées, centrifugées 4 min à 5000 tours/min, lavées deux fois avec 1 mL d'eau stérile. Le culot cellulaire est repris dans 1 mL d'eau stérile. Trois dilutions

successives, au $1/10^{\text{ème}}$, au $1/100^{\text{ème}}$ et au $1/1000^{\text{ème}}$ sont réalisées à partir de cette suspension. Des gouttes de 10 μL de chaque dilution sont déposées sur milieu gélosé 2x YNB dans des boîtes de Pétri. La croissance est suivie tous les jours et des photos sont réalisées dès le deuxième jour.

III- Techniques de biologie moléculaire

III-1 Extraction d'ADN génomique

L'extraction d'ADN génomique est réalisée suivant la procédure décrite par Hoffman et Winston (Hoffman and Winston, 1987), basée sur un broyage mécanique des cellules en présence de détergents suivi de plusieurs étapes d'élimination des protéines et de l'ARN. Environ 5.10^9 cellules (cultivées une nuit sur YEPD à 28°C sous agitation à 200 tours/min) sont centrifugées 5 min à 3000 tours/min. Le culot est lavé dans 0,5 mL d'eau. Après centrifugation 5 secondes à 13 000 tours/min, le culot est repris dans 200 μL de tampon de broyage (Triton X-100 2% (p/v) ; SDS 1% (p/v) ; NaCl 100 mM ; Tris-HCl 10 mM; pH 8,0 et EDTA 1 mM). Les cellules sont alors mécaniquement cassées par agitation au vortex pendant 4 min en présence de 0.3 g de billes de verre (diamètre 0,45 mm). L'extraction de l'ADN est effectuée en présence de 100 μL de phénol à pH 8,0 et de 100 μL de chloroforme/alcool isoamylique (IAA) (24/1, v/v). Après addition de 200 μL de tampon TE (Tris-HCl 10 mM; pH 8.0 et EDTA 1 mM), la phase aqueuse contenant les acides nucléiques est récupérée après une centrifugation de 5 min à 13 000 tours/min. Une seconde étape d'élimination des protéines est réalisée en ajoutant 250 μL de phénol et 250 μL de chloroforme/IAA à la phase aqueuse. Les deux phases sont centrifugées 5 min à 13 000 tours/min après avoir été vortexées pendant 2 min. Les acides nucléiques dans la phase aqueuse sont précipités à l'éthanol absolu (100%, v/v) et repris dans 400 μL de tampon TE. L'hydrolyse enzymatique des ARNs est réalisée à 37°C pendant 30 min par ajout de 30 μg de RNase A. Une précipitation à l'éthanol absolu (100%, v/v) en présence de 40 μL d'acétate d'ammonium à 3 M suivie d'un lavage du culot par l'éthanol 70% (v/v) permettent de purifier l'ADN. Le culot d'ADN est repris, après séchage, dans 50 μL de tampon EB (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) et l'échantillon est conservé à -20°C .

III-2 PCR : amplification de l'ADN

Les réactions de PCR ("Polymerase Chain Reaction") sont réalisées dans un thermocycleur T3 (Biometra®). Environ 100 ng/ μL de matrice est amplifiée dans un volume réactionnel de 50 μL contenant 500 nM de chaque amorce, le tampon spécifique à la

polymérase, 1,5 mM de $MgCl_2$, 200 μM de dNTPs et 1 U d'ADN polymérase DyNazyme[®] EXT. Le programme de PCR repose sur 30 cycles d'amplification comprenant trois étapes : (i) dénaturation des 2 brins de l'ADN par chauffage 45 secondes à 95°C, (ii) hybridation, au cours de laquelle les amorces s'apparient sur l'ADN. La température de cette étape, dont la durée est généralement fixée à 30 secondes, dépend de la composition de l'amorce en bases puriques et pyrimidiques, de sa longueur et de sa concentration dans la solution. Pour les oligonucléotides utilisés pour notre étude, une température d'hybridation de 55 °C a été calculée par la formule: Temps hybridation = (4°C pour chaque G et C) + (2°C pour chaque A et T). (iii) élongation du fragment d'ADN par la polymérase pendant 1 min à 72°C. A la fin des 30 cycles, une étape d'élongation supplémentaire de 5 min à 72°C est effectuée. Les fragments d'ADN obtenus par PCR et destinés à la transformation des levures sont purifiés à l'aide du kit QIAquick PCR Purification (Qiagen[®], USA) qui permet d'éliminer les sels et les protéines.

III-3 Electrophorèse en gel d'agarose

Les fragments linéaires d'ADN sont séparés sur gel d'agarose en fonction de leur taille. Les gels contiennent de 0,8 % d'agarose dans du tampon TBE (TrisHCl, acide borique, EDTA) ainsi que 0,2 $\mu g/mL$ de bromure d'éthidium (BET). Les conditions de migration dépendent de la taille du gel et de celle des fragments d'ADN.

III-4 Transformation des levures

Le protocole utilisé (Ito et al., 1983; Schiestl and Gietz, 1989) repose sur la pénétration d'ADN exogène lors d'un choc thermique dans des cellules rendues compétentes par traitement à l'acétate de lithium (LiAc).

Les cellules sont récoltées en phase exponentielle de croissance ($DO_{600nm} = 1,8$ à 2,2) par centrifugation 5 min à 2500 tours/min. Après lavage par 40 mL de tampon Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), elles sont reprises dans 50 mL de tampon LiAc (LiAc 0,1 M, Tris-HCl 10 mM, pH 7,5) et la suspension cellulaire est incubée 40 min à température ambiante sous agitation modérée. Les levures sont récoltées par centrifugation et reprises dans 2,25 mL de tampon LiAc. Un échantillon contenant 100 μL de cette suspension et 10 μL d'ADN de sperme de

hareng (10 mg/mL) préalablement dénaturé par chauffage (5 min à 100°C), et environ 4 µg de fragment linéaire d'ADN . est incubé 10 min à température ambiante. Après ajout de 300 µL d'une solution de PEG4000 50% (v/v, tampon LiAc), la suspension est incubée successivement 10 min à température ambiante puis 15 min à 42°C. Les cellules sont centrifugées et le culot est repris dans 1 mL de YEPD puis les cellules sont incubées 1 heure à 28°C. Après élimination du milieu, les cellules sont reprises dans 1 mL de tampon Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) et étalées sur milieu gélose sélectif.

III-5 Méthode de "Short Flanking Homology PCR" (SFH-PCR)

La méthode SFH-PCR est utilisée pour interrompre un gène *in situ* ou intégrer un gène par recombinaison homologue (Wach, 1995). Elle est basée sur l'amplification d'un module (ici *kanMX4*) contenant un gène conférant la résistance à un antibiotique (ici la généticine). L'intégration est dirigée à l'aide de longs oligonucléotides (60 pb) comportant des séquences homologues aux régions situées de part et d'autre de la région à cibler. Les oligonucléotidiques comprennent deux parties: la partie 3', constituée de 20 pb homologues à la séquence du module marqueur (*kanMX4*), la partie 5', d'une longueur de 40 pb environ, est homologue a la région cible de l'ADN. Ces deux amorces permettent d'amplifier par PCR un fragment permettant le remplacement de la région cible par recombinaison homologue. Les amorces utilisées sont décrites dans le **Tableau MM 2**. Après transformation, les cellules ayant intégré le fragment sont sélectionnées grâce à la généticine (200 ng/mL) ou à l'hygromycine (100 µg/mL) présent dans le milieu de culture. Plusieurs clones sont alors testés afin de vérifier l'intégration du module au locus désiré.

III-6 Extraction des ARN totaux

Pour chaque prélèvement, quatre extractions indépendantes sont réalisées à partir de 10⁹ cellules. Les cellules sont centrifugées 2 min à 3000 tours/min. Le culot cellulaire est ensuite lavé avec 1.5 mL d'eau DEPC (eau traitée 1 nuit au diéthylpyrocarbonate puis stérilisée 15 min à 120°C). Après une centrifugation de 15 secondes à 8000 tours/min, le surnageant est éliminé et les cellules sont plongées rapidement dans un bain de méthanol à -80°C ou d'azote liquide et sont conservées à -80°C. Les culots cellulaires congelés sont repris dans 400 µL de

Trizol (Invitrogen[®]) puis 300 μ L de billes de verres (diamètre 0,45 mm, traitées à l'acide nitrique et chauffées une nuit à 180°C) sont ajoutés. Les tubes sont agités vigoureusement au vortex 8 min, et la phase liquide supérieure est récupérée puis transférée dans un tube de 13 mL. Les billes de verres sont rincées avec 500 μ L de Trizol qui sont transférés dans le même tube de 13 mL. Pour chaque échantillon, le volume total est ensuite ajusté à 4 mL avec du Trizol. Les tubes sont incubés pendant 5 min à température ambiante. 800 μ L de chloroforme sont ajoutés et les tubes sont agités par vortex 15 secondes afin de former une émulsion. Les tubes sont incubés 2 min à température ambiante puis centrifugés 15 min à 10000 tours/min à 4°C. La phase aqueuse (environ 1,2 mL) est récupérée délicatement et transférée dans un tube de 13 mL. L'ARN est précipité par ajout d'un volume d'alcool isopropylique (-20°C, Fluka[®]). Après incubation 10 min à température ambiante, puis le culot d'ARN est récupéré par centrifugation (10 min, 10000 tours/min, 4 °C), puis rincé avec 2 mL d'éthanol 75% (v/v eau DEPC). Après transfert dans un microtube de 2 mL, l'échantillon est centrifugé 5 min à 10000 tours/min afin de récupérer le culot d'ARN, qui est séché ensuite environ 10 min à température ambiante, puis dissous dans 150 μ L d'eau DEPC. Les ARNs peuvent être conservés à -80°C.

III-7 Marquage des ADNc

Le marquage des ADNc a été réalisé à l'abri de la lumière, à l'aide du kit Chipshot Direct Labelling and Cleanup (Promega[®]), suivant le protocole défini par le fournisseur. Les ARN messagers sont soumis à une étape de transcription inverse afin d'obtenir un brin d'ADN complémentaire qui sera marqué par l'incorporation des bases fluorescentes Cy3-dUTP ou Cy5-dUTP dans un brin complémentaire d'ADN s'effectue par transcription inverse des ARN messagers en présence d'un mélange d'héxanucléotides (amorces aléatoires) et d'une amorce oligo-(dT). Chaque population d'ARN est marquée avec l'un des deux fluorochromes. Un traitement à la RNase (Promega[®]) est effectué pour chaque réaction de synthèse d'ADNc.

III-8 Purification et dosage des sondes

Après l'étape de transcription inverse, les ADNc marqués sont ensuite purifiés à l'aide du kit Chipshot Direct Labelling and Cleanup (Promega®) selon les indications du fournisseur, afin d'éliminer les fluorochromes non incorporés aux ADNc. La quantité de nucléotides fluorescents incorporés (exprimée en pmol) ainsi que la fréquence d'incorporation sont tout d'abord estimées par spectrophotométrie (NanoDrop 1000, Thermo Scientific®) de la manière suivante :

- Quantité d'ADNc synthétisée

$$\text{ADNc (ng)} = A_{260} \times 37 \times \text{volume total } (\mu\text{L})$$

- Quantité de fluorochromes incorporés :

$$\text{Cy3 incorporé (pmol)} = (A_{550} \times \text{volume total } (\mu\text{L})) / 0,15$$

$$\text{Cy5 incorporé (pmol)} = (A_{650} \times \text{volume total } (\mu\text{L})) / 0,25$$

- Fréquence d'incorporation des fluorochromes (FOI)

$$\text{FOI} = \text{quantité de chromophore (pmol)} \times 324,5 / \text{quantité d'ADNc (ng)}$$

Ce logiciel permet d'estimer Le taux d'incorporation des nucléotides marqués et la qualité du marquage sont ensuite évalués à partir de ces données, en utilisant le logiciel libre proposé par le site : <http://www.promega.com/applications/arrays/calculator/#ResultsView>. Les échantillons sont utilisés pour l'hybridation si la fréquence d'incorporation dans l'ADN est supérieure à 10 pour chaque fluorochrome. Pour une hybridation sur lame d'une taille de 24x60 mm, la quantité d'ADNc marqué à utiliser doit être comprise entre 36 à 50 pmol. Les quantités nécessaire des deux échantillons d'ADNc marqués (Cy3 et Cy5) sont regroupées et concentrées sous vide (speedvac). L'échantillon est ensuite dissous dans un volume final de 60 µL de tampon d'hybridation cDNA/Long Oligo (Pronto®).

III-9 Hybridation et détection

L'hybridation est réalisée sur des lames de verre UltraGAP, portant des oligonucléotides de 70 mers (Opéron®) représentant 6388 ORFs de *S. cerevisiae* (Plateforme Biopuces, Laboratoire d'ingénieries des systèmes biologiques et des procédés, INSA, Toulouse) L'hybridation statique des ADNc marqués, préalablement chauffés à 42°C pendant 5 min, est réalisée pendant 16 heures à 42°C dans une chambre d'hybridation Corning (Corning®) placée dans un four à hybridation. Les lavages de la lame sont effectués suivant le protocole du kit

Pronto Universal Hybridization Kit (Promega[®]). La lame est séchée par centrifugation 30 secondes puis immédiatement scannée à l'aide d'un scanner GenePix 4000B (Axon Instruments[®]). Les fluochromes ont été excités grâce à deux lasers de longueur d'onde de 532 nm (vert) et de 635 nm (rouge).

L'analyse d'image est réalisée à l'aide du logiciel GenePix Pro 3 (Axon Instruments[®]). Elle permet de mesurer l'intensité de la fluorescence à partir des pixels au niveau de chaque zone de dépôt de la lame.

III-10 Traitement et analyse des données d'expression des gènes

Le logiciel d'analyse statistique R version 2.11.1 avec le package limma (Smyth, et al., 2003; Smyth, 2004; Smyth, 2005) a été utilisé pour le traitement et l'analyse des données des biopuces. La comparaison de l'expression des gènes entre les 2 conditions de l'étude a été réalisée sur la base du ratio d'intensité des 2 fluorochromes exprimé en logarithme de base 2. Aucune correction du bruit de fond n'a été appliquée. L'efficacité d'incorporation des fluorochromes Cy3 et Cy5 étant différente du fait de leur différence d'encombrement stérique, une normalisation intra-lame ("printtiploess") a été appliquée. Un design "dye-switch" a été utilisé pour la comparaison des 3 réplicats biologiques : les ADNc de la condition d'étude 1 sont marqués 2 fois en Cy3 puis une fois en Cy5 et ceux de la condition d'étude 2 sont marqués 2 fois en Cy5 puis une fois en Cy3. Une normalisation inter-lame de type "quantile" a ensuite été appliquée afin de normaliser les distributions des ratios. Concernant l'analyse différentielle des données a été effectuée par une approche de modèle linéaire (package limma). Ce modèle permet d'évaluer si chaque gène est différentiellement exprimé d'un point de vue statistique en prenant en compte les duplicats de sondes sur chaque lame et en corrigeant les écart-types par la méthode empirique de Bayes. La procédure de Benjamini and Hochberg est appliquée afin de corriger la multiplicité des tests (approche de type FDR : False discovery rate) (Benjamini et Hochberg, 1995). Un gène est déclaré statistiquement différentiellement exprimé au seuil FDR de 5% si sa p-value ajustée est inférieure à 0,05.

IV- Techniques de biochimie

IV-1 Détermination d'activités enzymatiques

IV-1.1 Extraction des protéines totales de la levure

Les extraits cellulaires sont préparés à partir d'un volume de suspension cellulaire correspondant à 1×10^9 cellules. Les cellules sont collectées par centrifugation pendant 5 min à 3000 tours/min, lavées dans 15 mL de tampon phosphate 10 mM (pH 7,5) et reprises dans 1 mL de tampon phosphate 100 mM (pH 7,5). Après transfert dans un microtube de masse connue, le surnageant est éliminé par centrifugation pendant 15 secondes à 10000 tours/min. La masse de cellules humides est déterminée. Pour 100 mg de cellules humides, 500 μ L de tampon phosphate (100 mM, pH 7,5), 1 g de billes de verre (diamètre 0,45 mm), 5 μ L de dithiothreitol (DTT, 100 mM) et 2 μ L de solution de $MgCl_2$ (500 mM) sont ajoutés. Le broyage des levures est obtenu en réalisant 5 cycles successifs : agitation du tube (vortex) pendant 1 minute - refroidissement d'une minute dans la glace. Le mélange est ensuite centrifugé 3 min à 13000 tours/min et le surnageant (extrait brut) est utilisé pour doser l'activité enzymatique. Afin d'éviter la dénaturation des protéines, l'extrait est conservé sur la glace. Les activités sont mesurées extemporanément.

IV-1.2 Dosage des protéines

Les protéines ont été dosées en utilisant le kit BCA Uptima (interchim®), dont le principe repose sur la réduction de l'ion Cu^{2+} en ion Cu^+ lors de sa fixation sur les protéines en milieu alcalin. La détection des ions Cu^+ est réalisée à l'aide de l'acide bicinchoninique (BCA) formant un complexe coloré avec l'ion Cu^+ (562 nm). Cette méthode présente l'avantage d'être compatible avec la présence de détergents jusqu'à une concentration de 1%, mais elle est très sensible à la présence de composés réducteurs, d'EDTA et de tampons non alcalins.

IV-1.3 Détermination *in vitro* de l'activité enzymatique de la butanediol déshydrogénase (BDH)

La BDH NADPH-dépendante et la BDH NADH-dépendante convertissent l'acétoïne en 2,3 butanediol avec une oxydation équimolaire, respectivement, de NADPH et de NADH. L'activité de la butanediol déshydrogénase est déterminée en mesurant l'apparition du

NADP⁺ ou du NAD⁺ par spectrophotométrie (spectrophotomètre 932, Uvikon®) sachant qu'une 1 unité d'activité correspond à 1 µmol de NAD(P)H formée par min. La réaction se déroule à 25°C dans un volume réactionnel de 1 ml décrit dans le **Tableau MM 5**. La mesure commence après ajout de 20 µl d'extrait brut (toutes les solutions sont diluées dans de l'eau et en présence de BSA (0,5 mg/L).

IV-1.4 Calcul de l'activité spécifique des enzymes

A partir de la pente correspondant à l'apparition ou à la disparition du cofacteur mesuré à une absorbance de 340 nm, l'activité volumétrique (AV) est déterminée et calculée à partir de la formule de la loi de Beer-Lambert :

$$AV (U/L) = a \times V \times D \times v^{-1} \times \varepsilon^{-1} \times d^{-1}$$

a = coefficient de pente de la droite correspondant à l'apparition ou disparition du cofacteur (UDO/min)

V = volume total du mélange réactionnel (L)

D = facteur de dilution de l'échantillon

v = volume d'extrait utilisé (L)

ε = coefficient d'extinction du NADH ou du NADPH (6220 M⁻¹.cm⁻¹)

d = largeur de la cuve (1cm)

U = 1 x10⁶ mol/min

L'activité spécifique enzymatique, exprimée en U/mg de protéines, est alors calculée en divisant AV par la concentration en protéine dans l'extrait déterminé par le kit BCA (§IV-1.2).

IV-2 Détermination des composés de la biomasse

IV-2.1 Contenu en protéines

Les protéines sont extraites à partir d'un échantillon correspondant à 10 mg de poids sec, en présence de DMSO (50 % vol/vol) pendant 1 heure à 100 °C. Le dosage des protéines est effectué avec le kit BCA Uptima (interchim®) (§IV-1.2).

Mélange réactionnel	Quantité
Extrait brut dilué au 1/10 ^{ème}	20 µL
Tampon phosphate de sodium (100 mM, pH 7.0)	330 µL
BSA (10 mg/L)	50 µL
NAD(P)H (20 mM)	10 µL
Acétoïne (500 mM)	100 µL

Tableau MM 5 : Mélange réactionnel pour le dosage de l'activité enzymatique de l'enzyme BDH

IV-2.2 Contenu en acides aminés

Les acides aminés sont extraits à partir de 1 mg de biomasse par une hydrolyse acide (HCl, 6N) pendant 24 h à 110°C. Pour les acides aminés soufrés, les échantillons sont préalablement oxydés par de l'acide performique à 88 %. 200 µL d'une solution de norleucine à 500 nmol/mL (étalon interne) sont ajoutés à chaque échantillon. L'acide est évaporé sous azote, et le résidu est repris dans du tampon citrate de lithium (0,2 M, pH 2.2) puis filtré à 0,22 µm (Millipore[®], Millex-GV type "low protein binding durapore" PVDF). Les acides aminés sont ensuite quantifiés par chromatographie liquide échangeuse de cation (Biochrom[®] 30), en appliquant un gradient de température variant de 32 à 75 °C, de pH variant de 2,8 à 3,55 et de concentration en acétate de lithium variant de 0,2 à 1,65 M. La détection est spécifique grâce à la dérivation post colonne à la nihydrine des acides aminés. Les chromatogrammes sont traités par le logiciel HP1100 (Hewlett Packard[®]). La concentration des différents acides aminés est déterminée grâce à une gamme étalon et l'étalon interne.

IV-2.3 Contenu en lipides

Pour déterminer la quantité de lipides contenus dans les cellules, la méthode de Bligh et Dyer (1959) est utilisée. Elle consiste à peser la quantité de lipides obtenue par extraction au chloroforme/méthanol puis au chloroforme (Bligh and Dyer, 1959). La première extraction est réalisée en ajoutant 7,5 mL d'un mélange chloroforme/méthanol (50/50 v/v) à 2 mM de suspension cellulaire contenant entre 0.4 à 1 g/l de biomasse. Après décantation, la phase inférieure est récupérée et placée dans un tube préalablement pesé. Une deuxième extraction est réalisée à partir de la phase supérieure, en ajoutant 1,88 mL de chloroforme (récupération de la phase inférieure après décantation). Le chloroforme est évaporé sous flux d'azote jusqu'à ce que le poids du tube ne varie plus. La différence entre le tube vide et le tube contenant le résidu lipidique sec donne la quantité de lipides (Q_{lip}).

Connaissant la quantité de biomasse (Q_{MS}) utilisée (§II-3.3), il est possible de déterminer le pourcentage de lipides selon la formule : $\% \text{ lipides} = (Q_{lip} \times 100) \times Q_{MS}$.

IV-2.4 Contenu en carbohydrates

Les carbohydrates sont mesurés selon la méthode d'Herbert (Herbert, 1971). 5 mL d'acide sulfurique et 1 mM de phénol (5 g/L) ont été ajoutés à 1 mL d'échantillon (correspondant à 1,6 g/L de biomasse) (Schulze, et al., 1995). L'absorbance à 488 nm a été mesurée après 30 min d'incubation à température ambiante. Des solutions de glucose sont utilisées comme étalon externe. Les résultats sont corrigés en soustrayant l'absorbance relative à 0,445 et 0,264, respectivement, pour l'ADN et l'ARN (Lange and Heijnen, 2001).

IV-3- Extraction des métabolites intracellulaires

250 μ L de culture (0.5 à $1,95 \cdot 10^8$) sont ajoutés à 5 mL d'un mélange méthanol/eau (60/40 v/v) à -60°C immédiatement après prélèvement afin de bloquer le métabolisme des levures. La suspension est ensuite centrifugée (1 min, -10°C , 10 000 tours/min) afin de séparer les cellules de la phase liquide. Le culot cellulaire est congelé rapidement après élimination du surnageant pour stopper le métabolisme. Les cellules sont centrifugées et le surnageant est éliminé. 250 μ L d'une solution étalon interne IDMS (isotopique dilution mass spectrometry) sont ajoutés au culot cellulaire, avant extraction des métabolites intracellulaires par addition de 5 mL d'un mélange éthanol/eau (75/25 v/v) à 80°C . Le mélange est incubé 3 min à 80°C en vortexant 10 secondes toutes les min. Après refroidissement dans la glace, l'échantillon est centrifugé 10 min à 10000 tours/min. L'éthanol est éliminé du surnageant par évaporation sous vide et la phase aqueuse est conservée à -80°C .

V- Méthodes analytiques

V-1 Dosage des métabolites extracellulaires par HPLC

La chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) a été utilisée pour doser le glucose, l'éthanol, le glycérol, l'acétate, l' α -cétoglutarate, le succinate et le pyruvate à partir des surnageants prélevés des fermentations. Les échantillons sont préparés par dilution au $1/6^{\text{ème}}$ dans la phase mobile 0,008N H_2SO_4 utilisée pour la séparation HPLC et centrifugés (10 min, 10000 tours/min) avant injection. L'appareillage mis en œuvre est une chaîne chromatographique (Agilent Technologies[®]) composée d'une pompe isocratique délivrant un débit de 0,6 mL/min, d'un injecteur automatique d'une capacité d'injection de 25 μ L, d'une

pré-colonne (Bio-Rad[®]), d'une colonne Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm) (Bio-Rad[®]) constituée d'une résine styrène-divinylbenzène échangeuse d'anions. Le four est thermostaté à 45°C. La détection est réalisée à l'aide d'un réfractomètre et d'un spectrophotomètre UV à longueur d'onde fixe 210 nm. L'analyse des chromatogrammes est réalisée grâce au logiciel Chemstation (Agilent Technologies[®]). La concentration des composés dans les échantillons est déterminée par une méthode d'étalonnage externe à 4 points.

V-2 Dosage de l'acétoïne et du 2,3-butanediol

L'acétoïne et le 2,3-butanediol sont analysés en chromatographie en phase gazeuse (CPG) après extraction des composés volatils dans du chloroforme. Un étalon interne (hexanol dilué à 1:1000 v/v dans une solution d'éthanol à 10 % v/v) est utilisé afin de quantifier le rendement d'extraction des composés volatils dans la phase chloroformique. Un étalonnage externe (8 points) permet de déterminer les concentrations en acétoïne et 2,3-butanediol dans les échantillons. Les échantillons et les solutions étalons sont préparés simultanément de la façon suivante : dans des tubes pyrex 16 x 100 mm, 1mL d'étalon interne et 2,5 g de carbonate de potassium sont ajoutés à 1 mL d'échantillon. L'extraction est réalisée par addition de 2 volumes de chloroforme et incubation 1 h à température ambiante. La phase organique est ensuite séchée par addition de 200 mg de sulfate de sodium anhydre et analysée (injection 1 µL) par GC. L'appareillage utilisé comprend un chromatographe en phase gazeuse de type HP 5890 (Agilent Technologies[®]) équipé d'une colonne polaire BP20 (30 m x 0,53 mm x 1,0 µm, SGE[®]) et couplé à un détecteur à ionisation

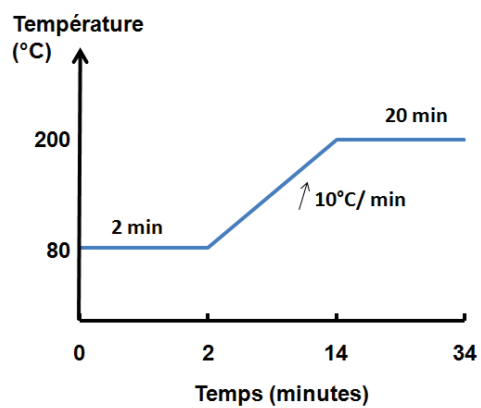


Figure MM 1 : Programme de température de la GC/MS pour le dosage de l'acétoïne et du 2,3-butanediol

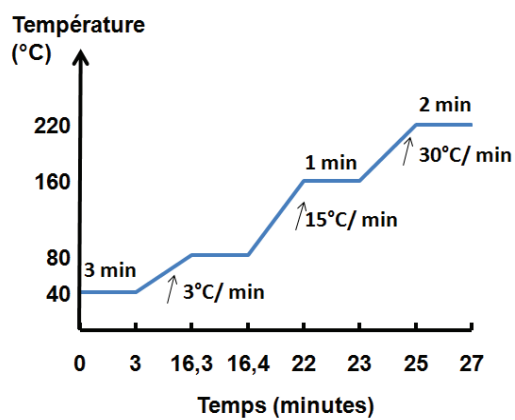


Figure MM 2 : Programme de température du four de la GC utilisé pour le dosage des volatiles

de flamme (FID). La température de l'injecteur est réglée à 240°C et celle du détecteur à 250°C. De l'hydrogène a été utilisé comme gaz vecteur à un débit constant de 4,8 mL/min. Le four est programmé pour réaliser le gradient de température suivant : (i) 2 min à 80°C puis (ii) la température est incrémentée de 10°C par min jusqu'à 200°C (**Figure MM1**). Le traitement des données est réalisé grâce au logiciel Chemstation (Agilent Technologies).

V-3 Dosage des composés volatiles

La concentration des esters et des alcools supérieurs est déterminée par chromatographie en phase gazeuse équipé d'un injecteur "headspace".

Pour standardiser les conditions d'équilibre entre la phase liquide et l'espace de tête, lors de l'analyse CPG, la concentration d'éthanol dans les échantillons a été ajustée à 11% d'éthanol. 50 µL d'un standard interne mL (4-méthylpentane-2-ol à une concentration de 3 g/L) et 1 g de NaCl sont ajoutés à 3 mL d'échantillons dans des flacons de 20 pour faciliter le passage dans la phase gaz des composés volatils en modifiant le coefficient de partage. L'incubation et l'injection sont réalisées avec un injecteur de type Headspace autosampler" HT200, qui permet de chauffer sous agitation le flacon 5 min à 50°C, puis d'injecter 1 mL de l'espace de tête dans la colonne de séparation BP20 (30 m x 0,53 mm x 1,0 µm, SGE®). La température de l'injecteur est fixée à 240°C. Le programme de température permettant la séparation des composés, détectés par un détecteur à ionisation de flamme, est indiqué dans la **Figure MM2**. Les chromatogrammes sont acquis et analysés avec le logiciel Chemstation (Agilent®).

Les composés sont détectés par spectrométrie de masse, par le détecteur QTrap triple mass 4000 (Applied Biosystems®), équipé d'un ionisateur électro spray turbo V MDS Sciex [Toronto et en utilisant un mode de détection MRM (Multiple Reaction Monitoring)]. Les conditions opératoires suivantes ont été appliquées pour l'analyse : pression du gaz nébuliseur de 40 psi, pression du gaz de désolvatation de 50 psi, température des gaz de désolvatation de 650 °C et tension capillaire de -3,3 kV. Cet appareil est piloté par le logiciel Analyst.

Les concentrations en métabolites ont été quantifiées grâce à une calibration externe à 7 points. Dans cette étude, les métabolites analysés appartiennent au métabolisme carboné primaire, comprenant ceux de la voie de la glycolyse, de la VPP, du TCA et du métabolisme

des purines et des pyrimidines. Les métabolites sont quantifiés de façon relative (résultats sous la forme du ratio aire ^{12}C / aire ^{13}C) et de quantification absolue normalisée en gramme de poids sec.

VI- Analyse des flux métaboliques

VI-1 Marquage isotopique au ^{13}C des acides aminés protéinogéniques

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) a été utilisée pour déterminer la distribution isotopique du carbone dans les acides aminés protéinogéniques obtenus au cours des cultures réalisées en présence de glucose 1- ^{13}C . La méthode utilisée est celle décrite par Christensen and Nielsen (1999).

Le culot cellulaire correspondant à 20 mg de cellules prélevées en phase de croissance ($\text{DO}_{600\text{nm}} = 3,6$) d'une culture réalisée sur milieu 2x YNB contenant 100 g/L de glucose dont 40% est marqué par du ^{13}C (1- ^{13}C -glucose/glucose 40/60).

400 μL d'eau et 400 μL d'acide chloridrique 6 M sont ajoutés au culot cellulaire. Une fraction de 700 μL (F700), destinée au dosage des acides aminés, est hydrolysée à 105°C pendant 16 h à 24 h. La fraction résiduelle de 100 μL (F100), destinée au dosage du glucose 6-phosphate intracellulaire (G6P), est hydrolysée 20 à 30 min à 105°C.

Après hydrolyse, l'acide chlorhydrique de la fraction F100 est éliminé par évaporation sous vide (speed vac) à 0°C pour éviter d'endommager le G6P. L'hydrolysate est dérivatisé par 50 μL d'eau, 500 μL d'acide acétique anhydre et 50 μL de chlorure d'acétyle. Pour la stabilisation du mélange, l'échantillon est incubé 24 h à température ambiante sous la hotte. Afin de déterminer la quantité de glucose marqué utilisée dans l'expérience, le glucose présent dans le milieu de culture est dérivatisé suivant le même protocole.

Après hydrolyse, 800 μL d'eau distillée sont ajoutés à la fraction F700, l'ensemble est centrifugé à 3000 g, 5 min à 4°C puis séparé en 4 fractions de 375 μL . L'acide chlorhydrique est évaporé à 105°C et les 4 hydrolysats sont utilisés pour la dérivatisation des acides aminés, étape nécessaire pour leur séparation en phase gazeuse.

Deux des hydrolysats sont dérivatisés par l'éthylchloroformate/trifluoroacetic anhydre (ECF-TFAA) en ajoutant 200 μL d'acide chloridrique (20 mM), 133 μL de pyridine/éthanol

(25/75 v/v) et 50 µL d'éthylchloroformate. Les dérivés sont ensuite extraits par 500 µL de dichlorométhane. La phase inférieure est récupérée par centrifugation 4 min à 13000 tours/min. Les deux autres hydrolysats sont dérivatisés par le (N, N') Diméthylformamide-diméthyl-acétate (DMF/DMA). Pour la dérivatisation 300 µL de DMF/DMA sont ajoutés à l'échantillon, puis les dérivés sont extraits par ajout de 50 µL de méthanol et 100 µL d'acétonitrile. Le surnageant est récupéré par centrifugation 4 min à 13000 tours/min.

La détection est réalisée à l'aide d'une GC-MS de type GC-17A/GCMS-QP5050A (Shimadzu®) fonctionnant en mode de ionisation Electron Impact et à 70 eV. La température de l'injecteur est de 230°C et le volume injecté est de 1 µL. Le four est équipé d'une colonne DB-1701 (Agilent®) (30 mm x 250 µm x 0,10 µm). Le flux d'hélium est de 1,0 mL/min. La température du détecteur est de 270°C et celle du quadripôle est de 105°C. Le spectromètre de masse fonctionne en mode "Single Ion Monitoring" qui permet d'analyser de 2 à 20 masses afin d'obtenir une sensibilité plus grande pour détecter les pics. Les paramètres utilisés dépendent du type de dérivatisation utilisé et sont renseignés dans la **Figure MM 3**.

VI-2 Détermination des flux intracellulaires

Les données brutes correspondent à l'intensité des isotopomères de masse d'un fragment d'acide aminé (ou d'un fragment de glucose, dans le cas de la dérivatisation du glucose et du glucose-6-phosphate). Dans un premier temps, les intensités sont corrigées en fonction de l'abondance naturelle de carbone ¹³C, puis le taux d'incorporation du carbone marqué de chaque acide aminé (ou fragment) appelé "summed fractional labeling" (SFL) a été calculé de la manière suivante :

$$SFL = 100 \times [(1.m_1 + 2.m_2 + \dots + i.m_i + \dots + n.m_n) \times (m_0 + m_1 + m_2 + \dots + m_i + \dots + m_n)^{-1}]$$

où m_i représente l'intensité corrigée des molécules contenant i carbones marqués. Pour quantifier les flux du MCC de *S. cerevisiae*, les données de SFL ont été intégrées à un modèle mathématique d'analyse de flux métabolique de type MFA. Le réseau stœchiométrique utilisé est adapté du modèle de Christensen et Nielsen (Christensen and Nielsen, 2000). Le modèle est contraint par les données des métabolites extracellulaires mesurés par HPLC, de flux drainés vers la biomasse et par les données SFL. Afin de minimiser les erreurs d'estimation

Méthodes de dérivatisation	ECF	DMF/DMA	Glucose
Programmation du four			
Description détaillée	Température initiale de 130°C pendant 3 min puis gradient de 40°C/min jusqu'à 260°C et maintien de cette température pendant 5,75 min	Température initiale de 60°C pendant 1 min puis gradient de 20°C/min jusqu'à 130°C , gradient de 4°C/min jusqu'à 150°C, gradient de 40°C/min jusqu'à 260°C et maintien de cette température pendant 4,25 min	Température initiale de 130°C pendant 3 min puis gradient de 40°C/min jusqu'à 260°C et maintien de cette température pendant 5 min

Figure MM 3 : Paramètres de la GC/MS pour le dosage des acides aminés et du glucose marqués

des flux, le modèle utilise un algorithme d'ajustement itératif. Pour chaque itération, la distribution des flux est calculée et ces données sont utilisées pour calculer les SFL à partir du modèle mathématique. L'algorithme est relancé afin de minimiser l'erreur entre les SFL estimés d'après la distribution de flux aux valeurs de SFL calculés d'après les données expérimentales et l'erreur entre les flux prédits et ceux mesurés expérimentalement. Les calculs de flux ont été réalisés avec Matlab 7.2. (Mathworks[®] Inc). Les données sont normalisées à 100 mmol de carbones consommés.

RESULTATS

CHAPITRE I :

**DEVELOPPEMENT ET
VALIDATION D'UN MODELE
METABOLIQUE DE *S. CEREVISIAE*
ADAPTE A L'ANALYSE DU
METABOLISME REDOX EN
CONDITIONS FERMENTAIRES**

Chapitre I : Développement et validation d'un modèle métabolique de *S. cerevisiae* adapté à l'analyse du métabolisme redox en conditions fermentaires

L'objectif de cette première partie a été de développer un modèle décrivant le réseau métabolique actif au cours du métabolisme fermentaire de la levure, permettant une analyse quantitative de la réponse métabolique à une perturbation de l'équilibre redox.

Dans toute démarche de modélisation, le choix du modèle à développer dépend de l'objectif visé. Une série de modèles du réseau métabolique a été publiée au cours de ces dernières années (Forster et al., 2003; Duarte et al., 2004; Nookaew et al., 2008) intégrant à chaque nouvelle version, plus de réactions et/ou une description plus fine du métabolisme. L'intérêt d'un modèle "genome-scale" est par exemple évident dans un contexte prédictif, ce type de modèle permettant de tester *in silico* des stratégies d'ingénierie et de suggérer des gènes cibles facilitant le développement de souches aux performances supérieures (Lee et al., 2005). Cependant de façon paradoxale, l'augmentation de la taille des réseaux métaboliques a montré qu'il existait souvent différentes alternatives dans la production de certains composés essentiels à l'organisme rendant plus difficile son analyse.

L'objectif de ce travail était avant tout explicatif. Il s'agissait en effet d'obtenir une meilleure compréhension du métabolisme NADPH en conditions fermentaires, en déterminant de façon quantitative la contribution des voies en réponse à une demande en NADPH imposée. Notre but était dès lors de disposer d'une méthode permettant d'exploiter facilement l'ensemble des contraintes liées aux voies du métabolisme redox dans ce contexte.

Notre idée initiale consistait donc à prédire la répartition des flux sur la seule connaissance du réseau stœchiométrique et de la maximisation de la production de biomasse par la méthode FBA. Cette idée initiale a été rapidement abandonnée après l'étude de la littérature (**Exposé bibliographique §I-4.6**) au profit de méthodes ayant de meilleure capacité prédictive. En effet, à l'image de ce qui avait été démontré par Covert et al. (2001), la prise en compte explicite des régulations (génétiques) des voies métaboliques augmente de façon significative la qualité des prédictions réalisées par la méthode FBA.

Nous avons donc à travers la prise en compte d'une connaissance a priori, éliminé du réseau global des réactions qui sont associées à des gènes non exprimés (ou suffisamment faiblement exprimés pour que les réactions soient négligées) dans les conditions fermentaires, sur la base de l'expertise présente au laboratoire, des données disponibles dans les bases de données spécialisées, et plus généralement des résultats de la littérature. Pour améliorer les prédictions du métabolisme redox nous avons décrit de façon exhaustive les voies métaboliques contribuant au maintien de l'équilibre d'oxydoréduction de la cellule.

Nous présentons dans la suite la démarche suivie pour construire notre modèle métabolique réduit, décrivant le réseau métabolique actif au cours du métabolisme fermentaire de la levure, et nous permettant une analyse quantitative de la réponse métabolique à une perturbation de l'équilibre redox. Nous présentons aussi dans ce chapitre un outil informatique qui a facilité l'exploration du réseau métabolique. Cet outil correspond à une adaptation au métabolisme levurien de l'outil *DynamoCell*, développé précédemment pour l'analyse du métabolisme de *Bacillus subtilis* (Goelzer, et al., 2008)

I- Modèle stœchiométrique de *S. cerevisiae* en conditions fermentaires

La spécialisation du réseau métabolique aux conditions fermentaires a été faite en deux temps. La première étape a consisté (1) à considérer uniquement le métabolisme carboné central de la levure, compte tenu du très faible poids des autres voies métaboliques dans l'équilibre de la balance du NADPH/NADP⁺ et des autres cofacteurs (NADH/NAD⁺ et ATP/ADP) ; (2) puis à identifier les enzymes présentes en fermentation. La deuxième étape a ensuite consisté à réduire le nombre total de réactions en agrégeant les réactions de biosynthèse de la biomasse aux précurseurs du métabolisme central. Nous avons donc renseigné 207 gènes à l'issue de la réduction et disposons d'un modèle réduit du métabolisme de la levure en conditions œnologiques comportant 87 réactions et 77 métabolites, qui seront utilisés pour l'analyse de flux. La suite de cette section détaille la démarche et les hypothèses utilisées pour obtenir le modèle.

I-1 Restreindre le modèle au réseau du métabolisme carboné central

La biomasse (**Tableau 10**) est constituée en majorité (95%) de carbohydrates, lipides, protéines et acides nucléiques. En conséquence, un grand nombre de voies métaboliques incluses dans le modèle "genome scale" ont un rôle négligeable à la fois sur le bilan de masse global (c'est-à-dire ont des flux négligeables vis-à-vis des flux principaux) et sur l'équilibre des cofacteurs en fermentation. De ce fait, la première étape de la construction de notre modèle a consisté à extraire le MCC du réseau métabolique global proposé par Nookaew et al. (2008). Le modèle inclut donc le métabolisme carboné central : glycolyse, nœud acétaldéhyde, VPP, TCA, cycle de la production et de la dégradation du glutamate et les principales voies impliquées dans la formation des acides aminés, lipides, ARN et ADN.

Comme aucun modèle de la littérature ne décrivait au moment du démarrage de ce travail, de façon détaillée, les réactions actives en conditions de fermentation, nous avons focalisé sur le choix des réactions qui sont actives et inactives dans les conditions fermentaires.

	Contenu cellulaire (% , g/g)
Carbohydrates	37.5
Lipides	3.5
Protéines	47.0
ARN	7.0
ADN	0.0
Autres	5.0

**Tableau 10 : Répartition de la composition de biomasse de la souche
CBS 8066 (Verdyun et al., 1991).**

I-2 Adaptation du réseau au métabolisme fermentaire

La seconde étape de la construction du modèle a consisté à identifier les réactions qui sont actives dans les conditions fermentaires. Toutefois, certaines réactions décrites comme inactives en fermentation, mais ayant un intérêt vis-à-vis de notre problème ont été conservées dans le réseau métabolique mais leur flux a été contraint à zéro a priori. Cela pourra permettre, si nécessaire, d'explorer des scénarios alternatifs en ce qui concerne la consommation ou la production du NADPH et NADH.

I-2.1 Choix des transporteurs extracellulaires en fermentation

L'ensemble de nos expérimentations a été mené en utilisant du glucose comme seule source de carbone. Seule l'entrée de ce substrat a été prise en compte dans le modèle. En fermentation œnologique, la majorité du glucose est transformée en CO₂ et en éthanol, qui sont tous deux transportés par simple diffusion. Nous avons considéré que l'excrétion des métabolites produits pendant la fermentation - glycérol, 2,3 butanediol, acétate, succinate, pyruvate, α -cétoglutarate- s'effectuait par simple diffusion sans coût énergétique. Le transport des acides organiques, qui sont sous forme dissociée dans le cytosol peut avoir un effet sur l'équilibre énergétique, mais leur production est limitée en conditions fermentaires. Cependant, dans les conditions perturbées que nous avons étudiées, la production modifiée de métabolites, en particulier celle de l'acétate nous a conduit à rediscuter spécifiquement ce point (§IV-3.2).

I-2.2 Choix des réactions en fermentation

En conditions fermentaires, certaines enzymes ne sont pas fonctionnelles, du fait de mécanismes de régulation liés aux conditions environnementales, notamment la présence de fortes concentrations en sucres et la limitation en oxygène (présence de traces d'oxygène en début de procédé). Ainsi, certaines enzymes de notre réseau, listées ci-dessous, ont été considérées comme inactives (flux contraint à zéro) :

- les réactions de la gluconéogenèse telles que la fructose-1,6-biphosphatase Fbp1p, la phosphoenolpyruvate carboxykinase Pck1p, et l'alcool déshydrogénase Adh2p (Klein et al., 1998), soumises à la répression catabolique par le glucose
- les réactions actives uniquement en conditions aérobies comme la glycérol kinase Gut1p, la glycérol-3-phosphate déshydrogénase Gut2p (Sprague et Cronan, 1977), le cycle glyoxylate (Icl1p, Mls1p) (Lorenz et Fink, 2001) et le complexe succinate déshydrogénase (complexe Sdhp) (Camarasa et al., 2003)
- les réactions de la chaîne respiratoire dans la mitochondrie
- les réactions utilisant l'oxygène comme substrat (par exemple la synthèse des stérols).

I-2.3 Choix des isoenzymes en fermentation

Lorsqu'une réaction enzymatique est catalysée par plusieurs isoenzymes (même localisation cellulaire, même cofacteur), nous avons intégré l'isoforme majoritaire en métabolisme fermentaire, en se basant sur les informations de la littérature et des bases de données *SGD* (www.yeastgenome.org) et *KEGG* (www.genome.jp/kegg/).

Transport du glucose : les équations bilans de transport de glucose sont identiques pour l'ensemble des transporteurs, quelle que soit leur affinité pour le substrat. Ainsi, seul le transporteur de faible affinité Hxt1p a été intégré au modèle sans que cela ait une incidence sur les prédictions obtenues.

Phosphorylation du glucose : seule l'hexokinase Hxk2p est active dans nos conditions (Winde et al., 1996).

Phosphofructokinases : Pfk1p et Pfk2p sont actives toutes les deux sur glucose, nous avons choisi arbitrairement Pfk1p.

Glycolyse basse : l'énolase Eno1p est l'isoforme majoritairement active en conditions anaérobies sur glucose. La phosphoglycérate mutase Gpm1p et la pyruvate kinase Pyk1p sont majoritaires quelles que soient les conditions de culture (Runquist et al., 2009 ; Entian et al., 1987 ; Przybyla-Zawislak et al., 1999).

Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénases : Tdh2p et Tdh3p sont les principales isoformes fermentaires (Delgado et al., 2001). La délétion de *TDH2* affectant plus fortement la croissance cellulaire que celle du gène *TDH3* (Delgado et al., 2001), l'isoenzyme Tdh2p a été intégrée dans le modèle.

Pyruvate carboxylases : Pyc1p et Pyc2p sont actives en fermentation, cependant l'activité pyruvate carboxylase d'un mutant *pyc1Δ* est 3 fois plus faible que celle d'un mutant *pyc2Δ* (Brewster et al., 1994). L'isoenzyme Pyc1p a été prise en compte.

Formation d'éthanol : la pyruvate décarboxylase Pdc1p est majoritaire quelles que soient les conditions de culture (Pronk et al., 1996) et l'alcool déshydrogénase Adh1p est la principale isoforme fermentaire (Leskovac et al., 2002).

Formation de glycérol : l'isoenzyme Gpd1p joue un rôle majeur dans la formation de glycérol, particulièrement dans les premières heures d'exposition à une forte concentration de sucre et une souche délétée pour *GPD2*, en conditions de fermentation, ne produit seulement que 20 % de moins que la souche sauvage (Remize et al., 2003). *GPP1* est induit en conditions anaérobies (Pahlman et al., 2001). Nous avons donc inclus les gènes *GPD1* et *GPP1* dans le modèle.

VPP : quelles que soient les conditions de culture, les isoenzymes majoritaires de la VPP décrites dans la littérature sont Sol3p (6-phosphogluconolactonase), Gnd1p (6-phosphogluconate déshydrogénase) et Tkl1p (transcétolase) (**Exposé bibliographique §II-4.1.1**).

TCA : en fermentation, la succinate déshydrogénase (Sdhp) n'est pas active (**Exposé bibliographique §II-1**) et seules les fumarate réductases mitochondriales et cytoplasmiques Osm1p et Frd3p sont considérées dans le modèle. Les activités aconitase Aco1p et Aco2p ont été considérées respectivement dans le cytoplasme et la mitochondrie (Przybyla-Zawislak et al., 1999). La citrate synthase cytosolique Cit1p et l'isocitrate déshydrogénase cytosolique Idp2p ne sont pas actives en fermentation (Sussia et al., 1984; Jia et al., 1997; Loftus et al., 1994) ce qui implique que l' α -cétoglutarate ne peut être lui produit que dans la mitochondrie à travers Idp1p (**Exposé bibliographique §II-4.1.3**).

	Flux libre	Flux fixé à 0
Déshydrogénases NADP(H)- dépendantes		
	Zwf1p	Idp2p
	Gnd1p	Gcy1p
	Bdh1p	Gdh3p
	Ald6p	
	Gdh1p	
	Mae1p	
	Idp1p	
	Ald5p	
Déshydrogénases NAD(H)- dépendantes		
	Tdh2p	Adh2p
	Adh1p	Ald2p
	Gpd1p	Ald4p
	Mdh2p	Gdh2p
	complexe	
	Pdhp	
	complexe	
	Idhp	
	complexe	
	Akgp	
	Mdh1p	

Tableau 9 : Liste des déshydrogénases incluses dans le modèle

I-2.4 Le statut spécifique des déshydrogénases

Nous avons intégré de façon exhaustive les réactions de déshydrogénases du MCC, bien que certaines ne soient pas actives en fermentation. Dans ce cas le flux à travers ces réactions a été fixé à 0 (**Tableau 9**). Lors des analyses, afin d'étudier l'ensemble des contraintes redox, la contrainte sur ces réactions pourra être levée. Une attention particulière a été portée aux isoenzymes pouvant utiliser à la fois les couples NAD(H) ou NADP(H) en tant que cofacteur. Dans la plupart des cas, les deux réactions ont été intégrées au modèle, ce qui permettra d'étudier l'effet sur l'équilibre redox, du choix d'une des deux réactions. Cela est notamment le cas pour les acétaldéhydes déshydrogénases cytosoliques NADP et NAD dépendantes, respectivement Ald6p et Ald3p, les deux acétaldéhydes déshydrogénases mitochondriales NADP⁺ (Ald5p) et NAD⁺ (Ald4p) dépendantes, et des isocitrates déshydrogénases mitochondriales : Idp1p NADP⁺-dépendante et complexe IDH utilisant le NAD⁺.

I-3 Réactions de biosynthèse

La troisième étape de la construction du modèle a consisté à identifier puis à agréger les réactions anaboliques en portant une attention particulière sur les informations liées au NADPH (et NADH).

I-3.1 Compartimentation des réactions de biosynthèse

Comme la membrane interne de la mitochondrie n'est pas perméable au NAD(H) et au NADP(H) (Jagow and Klingenberg, 1970), la localisation des réactions de biosynthèse au sein du cytosol ou de la mitochondrie peut avoir un effet important non seulement au niveau de la distribution globale des flux, mais plus encore sur les balances NADPH/NADP⁺ et NADH/NAD⁺ dans le cytosol et la mitochondrie. Il s'agit donc tout d'abord d'affecter avec le moins d'ambiguïté possible les réactions de biosynthèse des constituants de la biomasse dans un compartiment cellulaire. Il est acquis que les lipides, les carbohydrates et les acides nucléiques sont formés dans le cytosol. Par contre, certaines étapes des réactions de biosynthèse des acides aminés peuvent être soit cytoplasmiques soit mitochondriales.

Synthèse des acides aminés	Localisation des réactions pour la synthèse des acides aminés		Localisation des réactions de transamination	
	Cytosol	Mitochondrie	Cytosol	Mitochondrie
Alanine		x		x
Arginine	x	x	x	
Asparagine	x		x	
Aspartate	x		x	
Cysteine	x			
Glycine	x			
Glutamine	x			
Histidine	x			
Isoleucine	x			
Leucine		x	x	
Lysine	x		x	
Methionine	x			
Phenylalanine	x			
Proline	x		x	
Serine	x			
Threonine	x			
Tryptophane	x			
Tyrosine	x			
Valine		x	x	

Tableau 10 : Localisation des réactions impliquées dans la synthèse des acides aminés

Alanine : la synthèse de l'alanine est catalysée par l'alanine transaminase à partir du pyruvate. Il existe deux isoenzymes, mitochondriale et cytosolique, codées respectivement par les gènes *ALT1* et *ALT2*. L'isoenzyme Alt1p a été démontrée comme l'enzyme principale (Blank et al., 2005). Par conséquent, le précurseur de l'alanine est le pyruvate mitochondrial.

Arginine : la première réaction de la synthèse de l'arginine est catalysée par l'acétyl glutamate synthase Arg2p. Cette enzyme est mitochondriale donc le précurseur de cet acide aminé est le glutamate mitochondrial.

Proline : la première réaction de la synthèse de la proline est catalysée par la γ -glutamyl kinase Pro1p. Cette enzyme est cytosolique donc le précurseur de cet acide aminé est le glutamate cytosolique.

Aspartate et asparagine : la synthèse de l'aspartate et l'asparagine est catalysée par l'aspartate aminotransférase à partir de l'oxaloacétate. Il existe deux isoenzymes Aat1p mitochondriale et Aat2p cytosolique. L'isoenzyme Aat2p a été démontrée comme l'enzyme principale (Verleur et al., 1997), le précurseur de l'aspartate et de l'asparagine est l'oxaloacétate cytosolique.

Isoleucine : La première étape de la formation de l'isoleucine et de la thréonine est catalysée par une aspartate aminotransférase, dont l'isoforme majoritaire Aat2p est cytosolique. Le précurseur de la synthèse de ces acides aminés est donc l'oxaloacétate cytosolique. La dernière réaction de la synthèse de l'isoleucine est catalysée par la 4-methylthio-2-oxybutyrate transaminase codée par les gènes *BAT1* mitochondrial et *BAT2* cytosolique. Les isoenzymes Bat2p et Bat1p sont actives, respectivement, en phase stationnaire et en phase exponentielle (Eden et al., 1996). Par conséquent, nous avons considéré dans le modèle l'isoenzyme mitochondriale Bat1p.

Leucine et valine : La première réaction de la synthèse de la leucine et de la valine est catalysée par l'acétolactate synthase Ilv6p (Pang and Duggleby, 1999). Cette enzyme est mitochondriale, par conséquent le précurseur des deux acides aminés est le pyruvate mitochondrial. De même que pour la synthèse d'isoleucine, nous avons considéré que la dernière étape de la formation de leucine et de valine est catalysée par l'isoenzyme mitochondriale Bat1p.

Composants de la biomasse	Précurseurs	Réactions d'agrégation à partir des précurseurs du MCC
Acides aminés (synthèse)		
Alanine	PYRm	PYRm + NADPH => ALA + NADP
Arginine	AKG	AKG + 3 NADPH + NADPHm + NAD + CO2 + 7 ATP + ACCOAm + ATPm => ARG + 3 NADP + NADPm + NADH + 7 ADP + COAm + ADPm
Asparagine	OAA	OAA + NADPH + 3 ATP => ASN + NADP + 3 ADP
Aspartate	OAA	OAA + NADPH => ASP + NADP
Cysteine	3PG	3PG + 1 NAD + 5 NADPH + 5 ATP => CYS + NADH + 5 NADP + 5 ADP
Glutamine	AKG	AKG + NADPH + ATP => GLN + NADP + ADP
Glycine via serine	3PG	3PG + 1 NAD + 2 NADPH => GLY +1 NADH + 2 NADP
Glycine via threonine	OAA	OAA + 3 NADPH + 2 ATP => GLY + ACAL + 3 NADP + 2 ADP
Histidine	R5P	R5P + CO2 + 3 NAD + 3 NADPH + 6 ATP => HIS + 3 NADH + 3 NADP + 6 ADP
Isoleucine	AKG	OAA + PYRm + 4 NADPH + NADPHm + 2 ATP => ILE + CO2 + 4 NADP + NADPm + 2 ADP
Leucine	PYRm et ACCOAm	2 PYRm + ACCOAm + NADPHm + NADPH + NAD => LEU + NADPm + NADP + NADH + CO2 + AKG + ACCOAm + NADm + NAD + 4 NADPH => LYS + COA + CO2 + NADHm + NADH + 4 NADP
Lysine	AKG et ACCOAm	
Methionine	OAA	OAA + 7 NADPH + 7 ATP => MET + 7 NADP + 7 ADP
Phénylalanine	E4P et PEP	E4P + 2 PEP + 2 NADPH + ATP => PHE + 2 NADP + ADP + CO2
Proline	AKG	AKG + 3 NADPH + ATP => PRO + 3 NADP + ADP
Serine	3PG	3PG + NAD + NADPH => SER + NADH + NADP
Threonine	OAA	OAA + 3 NADPH + 2 ATP => THR + 3 NADP + 2 ADP
Tryptophane	E4P et PEP	E4P + PEP + R5P + 2 NADPH + 2 NAD + 5 ATP => TRP + CO2 + 2 NADP + 2 NADH + 5 ADP
Tyrosine	E4P et PEP	E4P + 2 PEP + NADPH + ATP => TYR + NADP + ADP + CO2
Valine	PYRm	2 PYRm + NADPHm + NADPH => VAL + NADPm + NADP + CO2
ADN/ARN (synthèse)		
dAMP	R5P et G3P	R5P + G3P + 9 ATP+ 4 NAD + 7 NADPH + 3 CO2 => dAMP + 9 ADP + 7 NADP + 4 NADH
dGMP		R5P + G3P + 11 ATP+ 4 NAD + 6 NADPH + 3 CO2 => dGMP + 11 ADP + 6 NADP + 4 NADH
GMP		R5P + G3P + 11 ATP+ 4 NAD + 5 NADPH + 3 CO2 => GMP + 11 ADP + 5 NADP + 4 NADH
AMP		R5P + G3P + 3CO2 + 9ATP + 4NAD + 6NADPH => AMP+ 9ADP+ 4NADH + 6NADP
dTMP	R5P et OAA	R5P + OAA + 7 ATP+ NAD + 2 NADPH + CO2 => dTMP +7 ADP + 2 NADP + NADH
dCMP		R5P + OAA + 7 ATP + NAD + 2NADPH => dCMP+ 7ADP+ NADH + 2NADP
UMP		R5P + OAA + 5 ATP + NAD + NADPH => UMP+ 5ADP+ NADH + NADP
CMP		R5P + OAA + 7 ATP+ NAD + NADPH + CO2 => CMP + 7 ADP + NADP + NADH
Acides gras (synthèse)		
A10-ACP	ACCOA	5 ACCOA + 8 ATP + 5 NADPH + 3 NADH => A10_0_ACP + 8 ADP + 5 NADP + 3 NAD + 5 COA
A12-ACP		6 ACCOA + 10 ATP + 6 NADPH + 4 NADH => A12_0_ACP + 10 ADP + 6 NADP + 4 NAD + 6 COA
A14-ACP		7 ACCOA + 12 ATP + 7 NADPH + 5 NADH => A14_0_ACP + 12 ADP + 7 NADP + 5 NAD + 7 COA
A16-ACP		8 ACCOA + 14 ATP + 8 NADPH + 6 NADH => A16_0_ACP + 14 ADP + 8 NADP + 6 NAD + 8 COA
A18-ACP		9 ACCOA + 16 ATP + 9 NADPH + 7 NADH => A18_0_ACP + 16 ADP + 9 NADP + 7 NAD + 9 COA
		AG-ACP => 1,7 ACCOA+ 3 ATP+ 1,7 NADPH+ 1,2 NADH
Lipides (synthèse)		
Triglycérides	G3P	3 AG_ACP + G3P + NADH => TRIGLY + NAD
Acides Phosphatidiques		G3P + NADH + 2 AG_ACP => PA + NAD
Phosphatidylcholine		2 G3P + 4 ATP + NAD + NADPH + 2 AG_ACP => PC + 4 ADP + NADP + NADH
Phosphatidylserine		2 G3P + ATP + NAD + NADPH + 2 AG_ACP => PS + ADP + NADP + NADH
Phosphatidylethanolamine		2 G3P + ATP + NAD + NADPH + 2 AG_ACP => PE + ADP + NADP + NADH
Phosphatidylinositol		G3P + G6P + 2 ATP + NADH + 2 AG_ACP => PINS + 2 ADP + NAD
Carbohydrates (synthèse)		
Carbohydrates	G6P	G6P +ATP => CARBH + ADP

Tableau 11 : Réactions de synthèse agrégées de la biomasse

Les abréviations utilisées dans les équations bilans sont récapitulées dans la liste des abréviations au début du manuscrit.

Les autres des acides aminés sont synthétisés dans le cytosol. L'ensemble des données de compartimentation sont récapitulés dans le (**Tableau 12**)

I-3.2 Le statut spécifique du glutamate

La première étape de la synthèse du glutamate à partir de l' α -cétooglutarate est catalysée par la glutamate déshydrogénase NADPH-dépendante, dont les isoformes mitochondriale et cytosolique sont codées respectivement par *GDH3* et *GDH1*. La réaction inverse forme de l' α -cétooglutarate à partir de glutamate et met en jeu la glutamate déshydrogénase NAD⁺-dépendante Gdh2p. L'inter-conversion entre le glutamate et l' α -cétooglutarate est un nœud métabolique clef impliqué dans le métabolisme redox et à l'interface entre le métabolisme azoté et carboné. Dans notre modèle, nous avons pris en compte les trois réactions Gdh1p, Gdh2p et Gdh3p. Le glutamate est impliqué dans l'anabolisme en tant que donneur préférentiel de groupement amine pour la synthèse des acides aminés. Le glutamate est ensuite régénéré *via* les glutamates déshydrogénases Gdh1p et Gdh3p. Le bilan net d'une réaction de transamination, d'un point de vue carbone et redox peut être réduit à son bilan de consommation de NADPH cytoplasmique ou mitochondrial. Ainsi, nous avons choisi de faire apparaître les réactions de transamination sous forme de consommation de NADPH mitochondrial ou cytoplasmique dans les voies métaboliques décrivant la synthèse des précurseurs de biomasse (**Tableau 12**).

I-3.3 Simplification par agrégation des réactions de biosynthèse

Le remplacement d'une série de réactions linéaires par une unique réaction résumant la voie par son bilan de masse est une étape supplémentaire de simplification du réseau métabolique. Elle correspond à une étape "d'agrégation du modèle métabolique" et ne modifie pas les bilans de masse et d'oxydoréduction si certaines précautions sont prises (en particulier, il faut veiller à ne pas introduire de contraintes fictives lors de cette étape).

Par exemple, la synthèse de l'asparagine est décrite par deux réactions à partir du précurseur métabolique oxaloacétate. A partir de ce précurseur, ces deux réactions et l'étape de transamination peuvent être traduites par une seule équation bilan (**Equation 6**):

Réactions	Equation	Réversibilité	Protéines	Descriptions
PYR_PYRm	PYR + H => PYRm + Hm	irréversible		pyruvate (transport)
ACCOA_ACCOA_m	ACCOA => ACCOAm	irréversible	Crc1p	acetyl-CoA (import modifié)
OAA_OAAm	OAA+H+ => OAAm + Hm	irréversible	Oac1p	oxaloacétate (transport)
ACET_ACETm	ACET <=> ACETm	réversible		acétate (transport)
SUCC_SUCCm	SUCC+Pim => SUCCm+Pi	irréversible	Dic1p	succinate (import)
MAL_MALm	MAL+Pim <=> MALm + Pi	réversible	Dic1p	malate (import)
MAL_SUCCm	MAL+SUCCm <=> MALm + SUCC	réversible	Dic1p	malate/succinate (antiport)
MALm_CIT	MALm+CIT <=> CITm+MAL	réversible	Ctp1p	malate/citrate (antiport)
ICITm_CIT	ICITm+CIT <=> CITm+ICIT	réversible	Ctp1p	isocitrate/citrate (antiport)
AKGm_CITm	AKG + CITm+ CO2 =>AKGm + CIT + CO2m	irréversible	Yhm2p	α -cétoglutarate/citrate (antiport)
AKG_AKGm	AKG <=> AKGm	réversible	Odc1p	α -cétoglutarate/2-oxodicarboylate (antiport modifié)
GLU_GLUm	GLU+H+ => GLUm + Hm	irréversible	Agc1p	L-glutamate transport (symport)
ETOH_ETOHm	ETOH <=> ETOHm	réversible		ethanol (diffusion)
ACAL_ACALm	ACAL <=> ACALm	réversible		acétaldéhyde (diffusion)
ATP_ATPm	ATPm +ADP <=> ATP + ADPm	réversible	Aac1p	ATP (transport)
CO2_CO2m	CO2 <=> CO2m	réversible		CO2 (diffusion)

Tableau 12 : Transporteurs mitochondriaux intégrés dans le modèle

Les abréviations sont récapitulées dans la liste des abréviations au début du manuscrit.



Les réactions d'agrégation à partir des précurseurs du MCC sont décrites dans le **Tableau 13**.

I-4 Echanges cytoplasme / mitochondrie

Le réseau métabolique de la mitochondrie pris en compte dans le modèle comprend les voies du TCA, les réactions catalysées par le complexe pyruvate déshydrogénase, l'acétaldéhyde déshydrogénase et l'alcool déshydrogénase. Il fait intervenir 21 métabolites. Il est nécessaire de prendre en compte dans le modèle les échanges de ces métabolites entre le cytosol et la mitochondrie, même si les données de la littérature concernant les transporteurs sont incomplètes, notamment au niveau du sens préférentiel de fonctionnement et de la régulation.

Une centaine de transporteurs ont été référencés dans le modèle "genome scale". Nous avons réduit ce nombre en ne considérant que (i) les transporteurs des métabolites présents dans le réseau mitochondrial et démontrés comme actifs en fermentation, et (ii) les transporteurs impliqués dans le maintien de l'homéostasie redox dans ce compartiment, notamment les transporteurs pouvant être impliqués dans les systèmes de navettes (échange potentiel de cofacteurs entre le cytosol et la mitochondrie). Sur cette base, nous avons donc intégré dans le modèle 16 transporteurs décrits dans le **Tableau 14**.

Il est à noter que le choix d'ajouter la compartimentation dans le modèle a des conséquences fortes sur la distribution des flux.

II- *DynamoYeast* : un outil d'exploration du métabolisme

Pour explorer le réseau métabolique, nous avons adapté à la levure un logiciel développé précédemment sous MATLAB 7.2 (MathWorks Inc.) afin d'étudier le métabolisme de *B. subtilis* (Goelzer et al., 2008). Nous présentons ici les développements que nous avons réalisés pour l'adapter à la levure.

metabolite.txt	reaction.txt	enzyme.txt	gene.txt	promoteur.txt	transFactor.txt	effecteur.txt
ICXX	IRXX	IEXX	IGXX	IPXX	ITFXX	EFFXX
name	enzyme=IEXX	name	SGD_ID	TFv=ITFXX + ITFXX -	name	name
pseudo	gene=IGXX	pseudo	product=IEXX	TFp=ITFXX + ITFXX -	regulP=IPXX	pseudo
	reactant=ICXX+ICXX	EC	regulT=IPXX		effecteur=EFFXX	
	product=ICXX+ICXX	gene=IGXX				
	type=irr/rev	reaction=IRXX				
	typeR=intermediate /	regulE=ICXX + ICXX				
	transport	effecteur=EFFXX				

Liste des abréviations utilisées pour chaque entité

IRXX	réactions
ICXX	métabolites
IEXX	enzymes
IGXX	gènes
IPXX	promoteur associé au gène permettant de lier les facteurs de transcription et les gènes
ITFXX	facteurs de transcription
EFFXX	effecteurs correspondant aux molécules tels que les ions H ⁺ ou NH ₃ ⁺
type	décrit la thermodynamique de la réaction
typeR	indique les réactions de transports
SGD_ID	ORF
name	nom du métabolites, de l'enzyme, du facteur de transcription ou de l'effecteur
pseudo	abréviation du métabolite, du gène ou de l'effecteur
EC	Enzyme Commission number : identifiant unique pour chaque enzyme
regulE	Régulation enzymatique et les métabolites associés à cette régulation
+	Activation
-	Inhibition
TFv	Facteurs de transcription vérifiés par Chip on Chip
TFp	Facteurs de transcription putatifs

Tableau 15 : Description de chaque entité du modèle

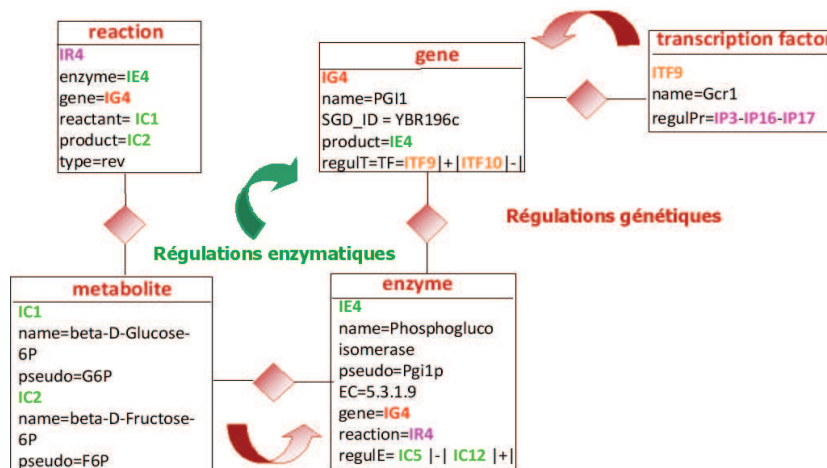


Figure 18 : Structure du modèle

Le modèle est construit sous forme de base de données et composé de 5 entités : les réactions, les métabolites, les enzymes, les gènes et les facteurs de transcriptions. Chaque élément correspond à un identifiant unique. Chaque métabolite correspond à un identifiant "IC" qui comprend un nom ("name") et une abréviation ("pseudo"). Les identifiants de ces métabolites sont utilisés pour décrire les réactions. La réaction est décrite par son substrat ("reactants") et son produit ("product"), la bidirectionnalité de la réaction ("type=rev ou irr"), l'identifiant de l'enzyme ("enzyme=IE") et l'identifiant du gène correspondant à l'enzyme ("gene=IG"). Chaque réaction a un identifiant "IR".

II-1 Structuration des informations

Le calcul de la distribution des flux repose d'une part sur la matrice stœchiométrique décrivant le réseau métabolique et d'autre part sur la compilation de l'ensemble des contraintes agissant sur les flux de ce réseau (internes ou au niveau des flux d'entrée et de sortie). Afin de pouvoir générer de façon automatique cette matrice et la liste des contraintes associées, les réactions et les métabolites qui leur sont associés sont décrits sous forme d'un identifiant unique. Le modèle est ensuite organisé sous forme structurée. L'ensemble des réactions et des métabolites sont 'listés' dans des fichiers à plat (reaction.txt, metabolite.txt). D'autre part, un de nos objectifs était de développer un modèle de connaissance, permettant d'accéder facilement aux principales données concernant le mode de fonctionnement de chaque réaction métabolique. Pour cela, l'ensemble des informations disponibles sur les enzymes, les gènes impliqués, le contrôle génétique et enzymatique a été intégré au modèle sous forme de 5 fichiers texte, correspondant aux entités : enzyme, gène, promoteur, facteur de transcription et effecteur. Pour chaque élément de la base de données, identifié de façon normalisée et unique (**Tableau 15**), un bref descriptif résume les principales connaissances, notamment ses relations avec les autres entités (**Figure18**).

II-2 Calcul et prédiction des flux

La méthode FBA est utilisée pour prédire la distribution des flux dans le réseau métabolique (**Exposé bibliographique §I-4.6**). La fonction "objectif" par défaut maximise la synthèse de la biomasse. La fonction "objectif" peut également optimiser d'autres paramètres tel que la production d'ATP, d'éthanol ou divers sous-produits (comme le glycérol).

Le problème d'optimisation FBA (problème de programmation linéaire) est résolu par la fonction MATLAB "linprog". L'ensemble des programmes est implémenté en MATLAB 7.2 (MathWorks Inc.).

II-3 Interface graphique de visualisation des flux

Afin de faciliter l'exploration du réseau, *DynamoYeast* dispose d'une interface graphique. Un fichier texte nommé map.txt décrit l'ensemble des coordonnées des éléments que nous avons souhaité faire figurer sur l'interface graphique (**Figure 19**). A partir de ce schéma, différentes fonctionnalités permettent d'explorer le réseau. Cette interface graphique permet de visualiser facilement l'ensemble des réactions métaboliques.

II-3.1 Information sur les réactions

Il est possible d'accéder aux informations liées à une réaction, regroupées dans la base de données. Le lien "*Information on reaction*" accède aux informations intégrées dans le fichier texte "reaction.txt" (IGXX, IEXX...) (**Tableau 15**) et affiche le nom du gène et de l'enzyme correspondant. Les **Figures 20** et **21** illustrent les informations concernant la première étape de la VPP. Par l'interface graphique, nous accédons directement à ces informations : cette réaction est irréversible, elle est catalysée par la glucose-6-phosphate déshydrogénase codée par le gène *ZWF1* (**Figure 20**) et est inhibée au niveau enzymatique par l'ATP et le NADPH. Deux facteurs de transcription Yap1p et Stb5p activent cette réaction (**Figure 21**).

II-3.2 Analyse systématique du réseau

Un des avantages de cet outil est de permettre la visualisation de l'ensemble des réactions faisant intervenir un cofacteur/métabolite donné. Par exemple, la **Figure 19** indique l'ensemble des réactions NADP(H)-dépendantes du métabolisme carboné central à partir de l'interface graphique. De même, *DynamoYeast* offre la possibilité d'accéder facilement aux informations sur la régulation, grâce à un menu déroulant à partir d'un gène ou d'une réaction. Il est possible de visualiser de façon globale l'ensemble des réactions régulées soit par un métabolite, soit par un facteur de transcription.

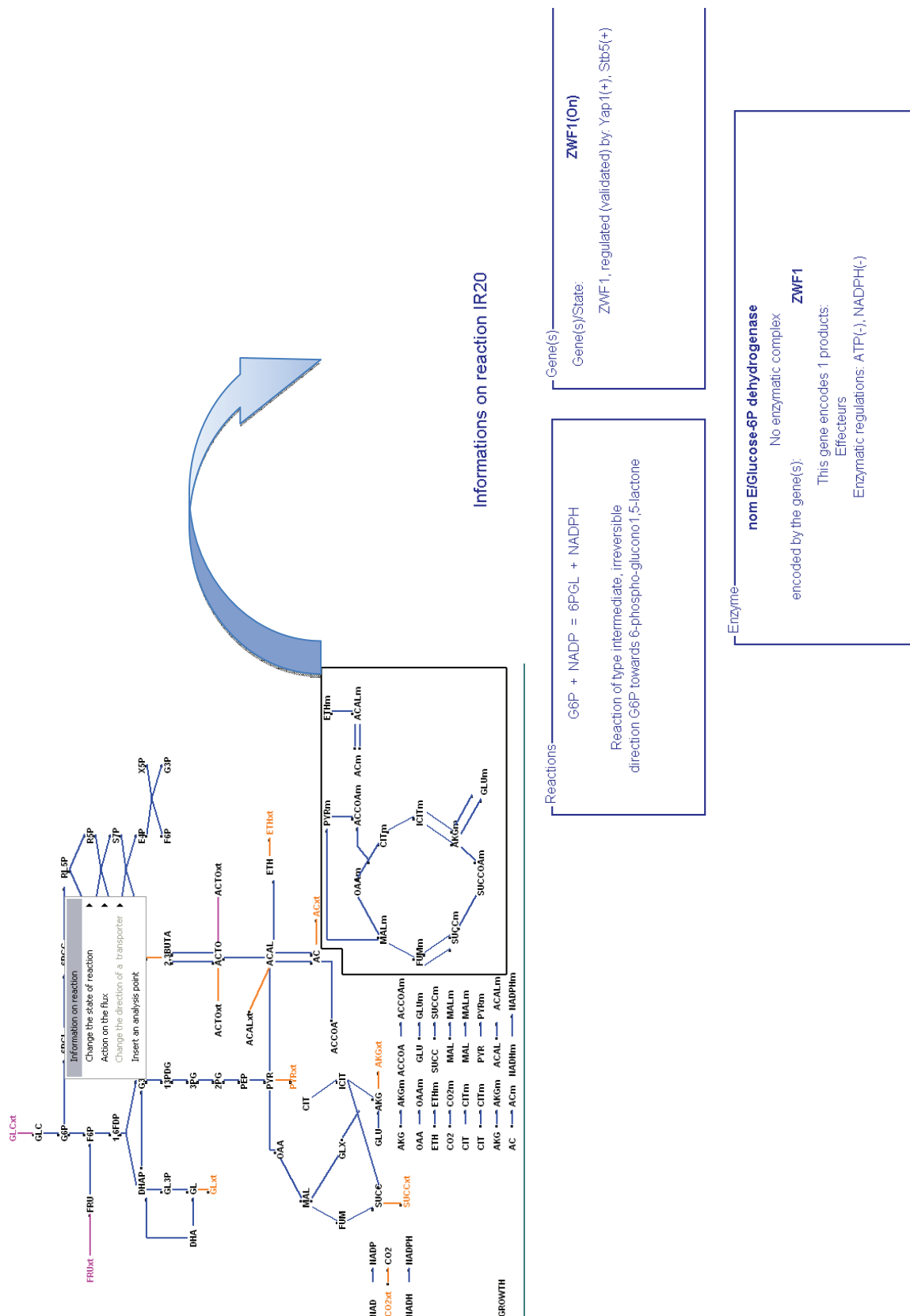


Figure 20 : Présentation de la description de chaque réaction à partir de l'interface graphique de *Dynamo Yeast*

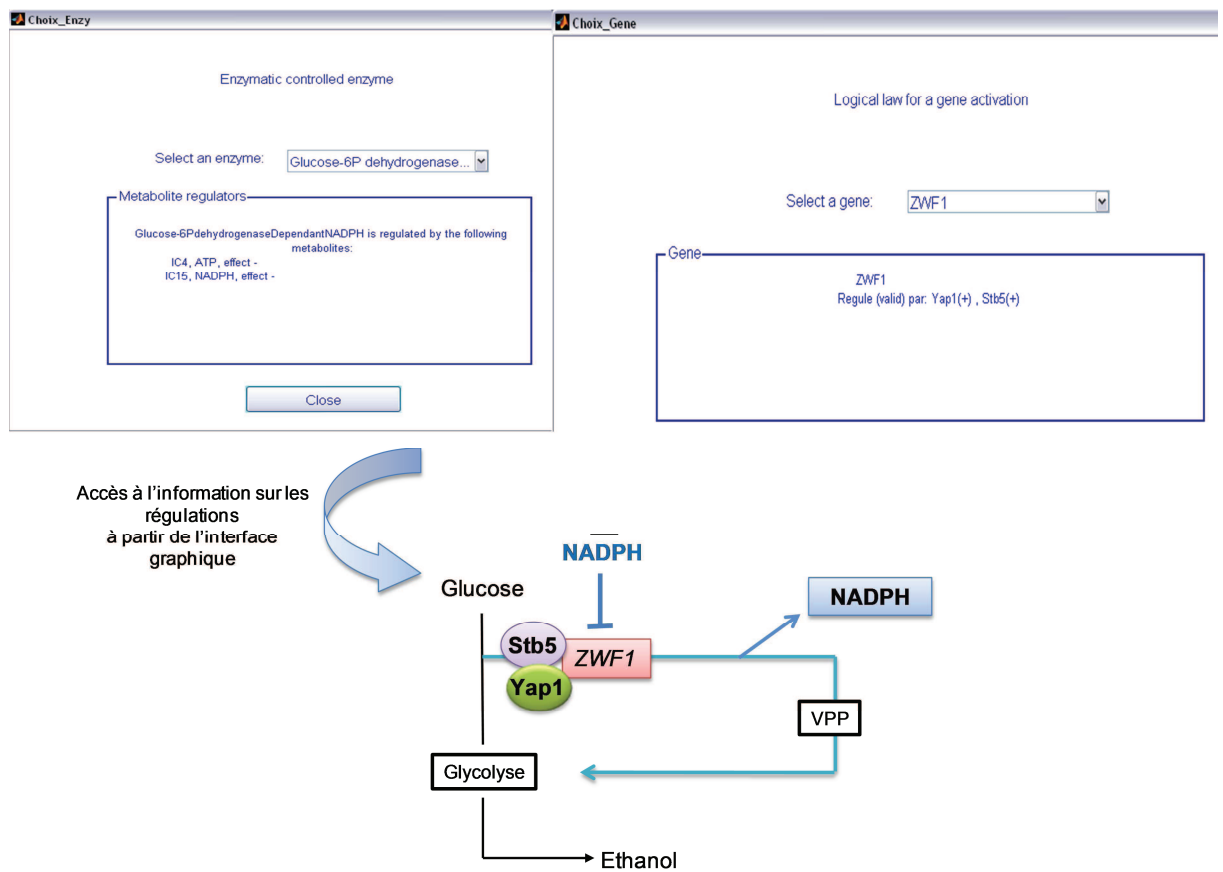


Figure 21 : Affichage des informations sur les régulations pour une réaction donnée

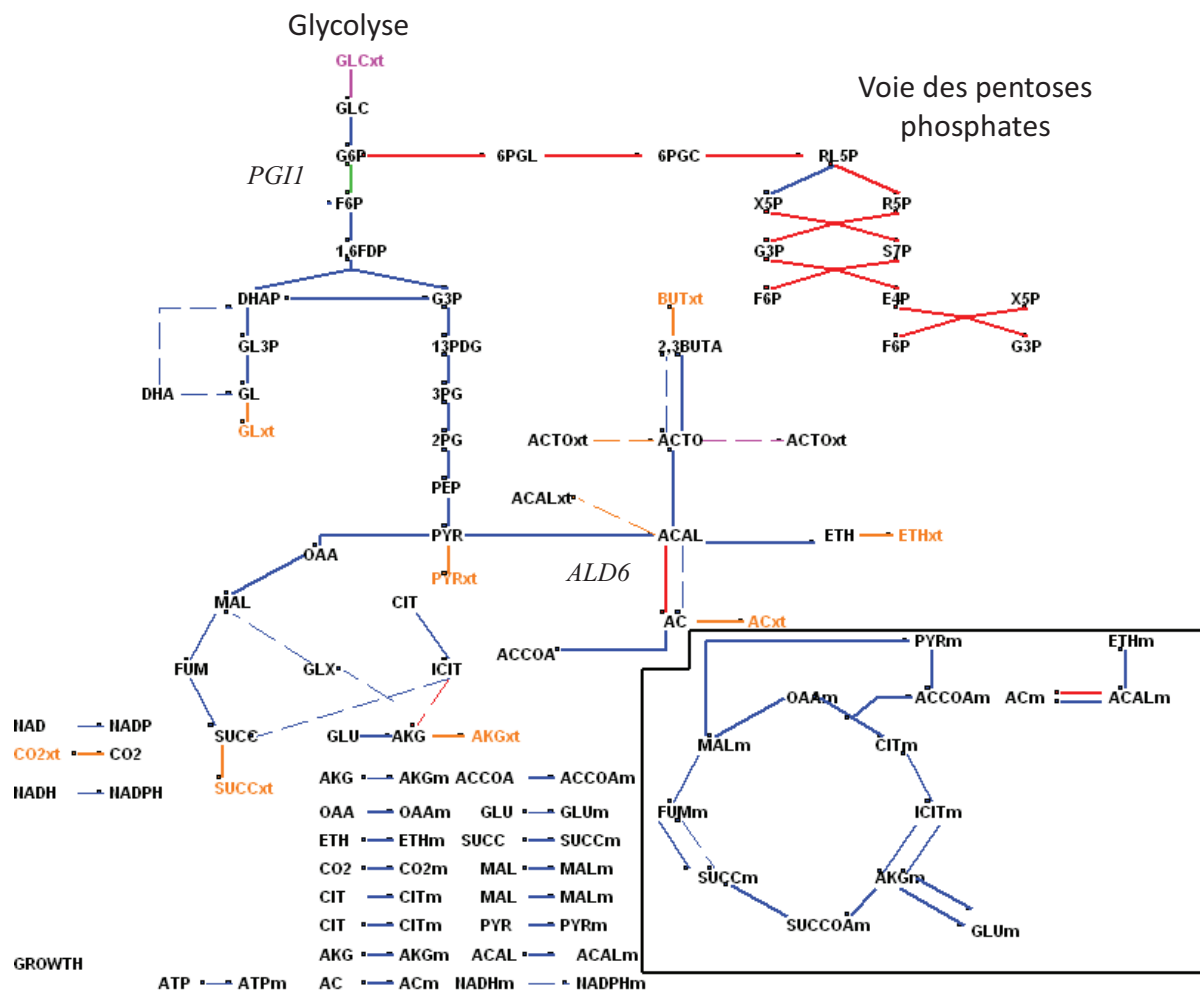


Figure 22 : Réactions enzymatiques activées (rouge) et réprimées (vert)
par le facteur de transcription Stb5p

Les réactions de la VPP sont activées par Stb5p tandis que PGII codant la réaction à la jonction entre la glycolyse et la VPP est réprimé. ALD6 est également activé par Stb5p.

L'aide de la visualisation des régulations par l'interface graphique permet d'analyser les régulations coordonnées qui contrôlent les flux métaboliques chez la levure. La **Figure 22** illustre les réactions qui sont contrôlées par le facteur de transcription Stb5p, et par cette visualisation nous voyons rapidement l'implication de Stb5p dans le contrôle de la VPP.

L'interface graphique permet également de visualiser l'ensemble de la distribution des flux obtenus par la résolution du problème FBA (**Figure 19**) et de modifier directement la topologie du réseau. En effet, l'interface de *DynamoYeast* permet de tester facilement différents scénarios ou hypothèses. Il est en effet possible d'ajouter de façon automatique, directement à partir de l'interface graphique, des contraintes supplémentaires au niveau du réseau. Ainsi le flux au travers de chaque réaction peut (i) soit être fixé à 0, ce qui revient à inactiver la réaction, par exemple pour éviter l'excrétion d'un sous-produit (ii) soit être imposé à une valeur donnée (qui correspond aux valeurs mesurées expérimentalement), (iii) soit être borné par une valeur maximale, lorsque seulement l'ordre de grandeur du flux est connu.

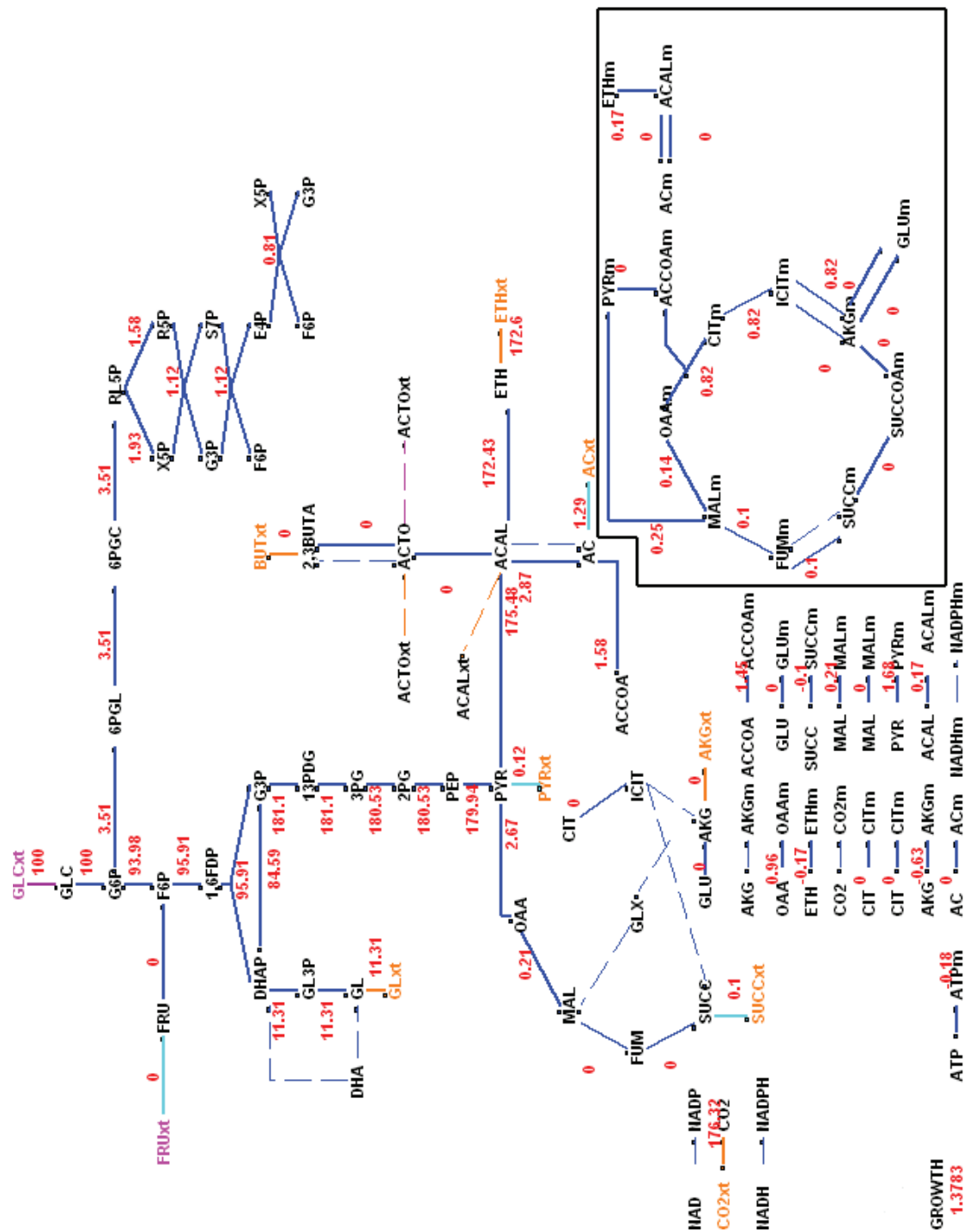
II-4 Validation de l'implémentation informatique du modèle

Nous avons validé l'implémentation informatique du réseau métabolique. Pour cela, les bilans de masse ont été calculés de façon systématique à chaque nœud du réseau métabolique lors d'une simulation FBA, afin de contrôler que la masse a été conservée ce qui se traduit par l'équation suivante : $\Sigma \text{ flux entrants} = \Sigma \text{ flux sortants}$ (**Equation 7**).

où les flux entrants correspondent aux différents flux de synthèse du métabolite considéré et les flux sortants correspondent à un flux vers un autre intermédiaire de la voie, une excrétion du métabolite ou un flux vers la biomasse, dans le cas de métabolites précurseurs.

La validation est immédiate pour la plupart des nœuds du réseau. Par contre, dans le cas des nœuds métaboliques correspondant à un précurseur pour la synthèse de biomasse, le flux vers la biomasse doit être calculé à partir du taux de croissance et de la composition de biomasse : $\mu \times \text{Précurseurs}_{\text{demand}}$ (**Equation 8**).

Par exemple, dans le cas du glucose-6-phosphate (G6P), la demande du précurseur G6P pour la biomasse est de $1,825 \text{ mmol.gDW}^{-1}$ avec un taux de croissance de $0,44 \text{ h}^{-1}$, d'où un flux sortant de :



$$r_{\text{biomasse}} = \mu \text{ Précurseurs}_{\text{demand}} = 0,44 * 1,825 = 0,8 \text{ mmol.gDW}^{-1}.\text{h}^{-1} \text{ (Equation 9)}$$

Le flux de formation de G6P calculé par le modèle est de 31,68 mmol.gDW⁻¹.h⁻¹, ce qui conduit bien à un bilan massique équilibré au niveau de ce nœud (**Figure 24**).

Une telle démarche, appliquée à l'ensemble des nœuds métaboliques du réseau, a permis de valider son implémentation informatique.

III- Validation expérimentale du modèle

III-1 Validation par comparaison avec les phénotypes associés à des mutants de délétion

Une première validation du réseau a été réalisée en comparant le phénotype d'un mutant de délétion (délétion *in vivo*) à la prédiction réalisée par le modèle en l'absence de cette même réaction (délétion *in silico*). Il existe alors trois cas possibles, permettant d'évaluer la pertinence de l'écriture de la réaction dans le modèle (**Tableau 16**) :

- (i) l'expérience et la prédiction coïncident, ce qui valide la pertinence de la réaction supprimée.
- (ii) la souche mutée est capable de survivre alors que le modèle prédit un phénotype létal : cela indique que d'autres réactions, qui n'ont pas été intégrées dans le modèle, existent dans la cellule et sont capables d'avoir le même rôle que la réaction manquante.
- (iii) la délétion est létale pour la levure mais le modèle prédit la survie : cela montre qu'une réaction présente et fonctionnelle dans le modèle n'est pas active en réalité.

La littérature rapporte un grand nombre de données sur le phénotype de croissance de mutants de délétion dans des conditions environnementales variées. Pour tester le modèle fermentaire, nous avons confronté les prédictions du modèle *DynamoYeast* avec les données de croissance en conditions de fermentation de certains mutants (**Tableau 17**).

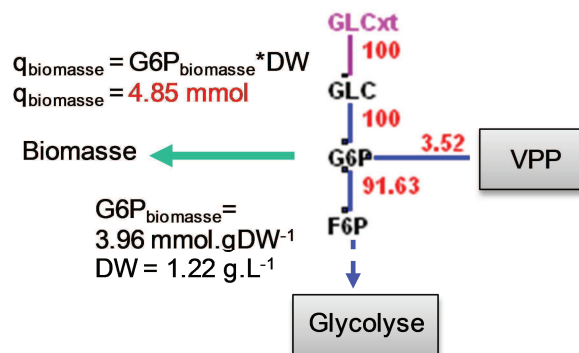


Figure 24 : Validation de la conservation de la masse au niveau du nœud métabolique G6P

		Prédiction létalité	
		VRAI	FAUX
Expérimentations létalité	VRAI	OK	Réaction(s) manquante(s) dans le modèle
	FAUX	Réaction mal définie dans le modèle	OK

Tableau 13 : Table de vérité de la létalité d'une souche pour une réaction entre les données expérimentales et les prédictions du modèle

	Prédictions DynamoYeast		Littérature		désaccord avec la littérature	Référence
	léta1 en fermentation	viable en fermentation	léta1 en fermentation	viable en fermentation		
Pgi1p	x		x			Aguilera, 1986
Pfk1p	x		x			Lobo and Maitra, 1983
Tpi1p	x		x			Compagno, 2001
Pgk1p	x		x			Lam and Marmur, 1977
Cdc19p	x		x			Maitra and Lobo, 1977
Zwf1p		x		x		Gorsich et al., 2006
Gnd1p		x		x		Gorsich et al., 2006
Rpe1p		x		x		Gorsich et al., 2006
Tal1p		x		x		Gorsich et al., 2006
Tkl1p		x		x		Gorsich et al., 2006
Gpd1p		x	x		x	Michnick et al., 1998
Gpp1p		x	x		x	Pahlman et al., 2000
Pdc1p	x		x			Hohmann, 1991
Adh1p		x		x		Paquin and Williamson, 1986
Ald6p		x		x		Saint-Prix et al., 2004

Tableau 17 : Comparaison entre les données prédites par *DynamoYeast* et les données *in vivo* des phénotypes des mutants du métabolisme carboné central en conditions fermentaires

(A)

	Littérature Albers et al., 1996	Contraintes DynamoYeast
	mmol.gDW ⁻¹	mmol
Glucose consommé	60.0 ± 6.0	36
Acetate	0.5 ± 0.2	0.3
Succinate	0.18 ± 0.1	0.11
Pyruvate	0.3 ± 0.06	0.18
	mmol.gDW ⁻¹	mmol.gDW ⁻¹
Demande ATP	74.6 ± 0.7	74.6

(B)

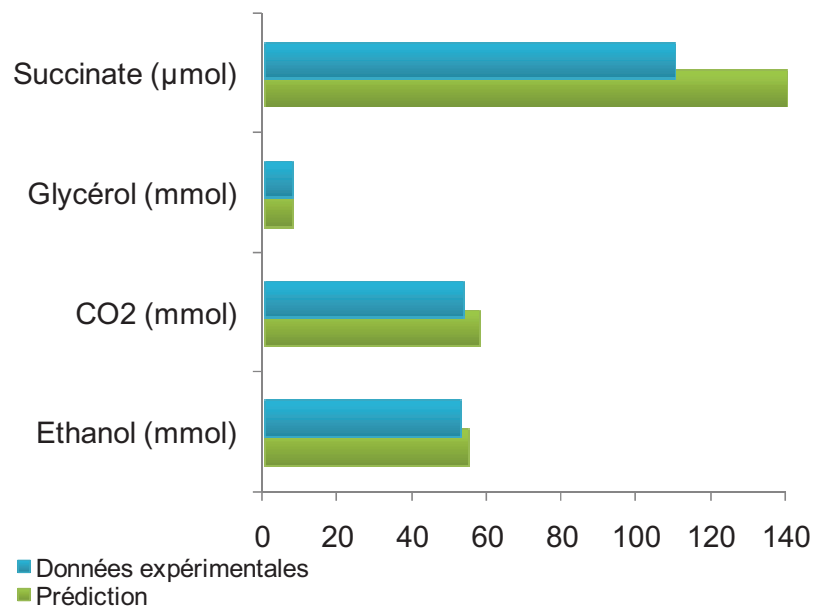


Figure 25 : Prédiction du modèle à partir de données expérimentales extraites de la littérature (Albers et al., 1996)

(A) Données expérimentales qui contraignent le modèle (B) Comparaison des données expérimentales et prédites par DynamoYeast.

En fermentation, il est connu que l'ensemble des gènes de la glycolyse et de la voie glycérol est essentiel *i.e.* leur délétion est létale (**Tableau 17**). Le modèle est en accord avec ces résultats expérimentaux, à l'exception de *gpd1Δ* et *gpp1Δ* pour lesquels *DynamoYeast* prédit la létalité des mutants alors que ces mutants sont viables (Michnick et al., 1997; Pahlman et al., 2000). Cette différence s'explique par la présence chez la levure de deux autres isoformes catalysant les 2 réactions impliquées dans la formation de glycérol à partir de DHAP (*Gpd2p* et *Gpp2p*), qui peuvent se substituer aux deux isoformes majoritaires (Lopes, 2000; Pahlman et al., 2001) et qui n'ont pas été intégrées dans le modèle.

III-2 Validation à partir des données en conditions fermentaires

La seconde étape de validation a consisté à comparer les prédictions du modèle *DynamoYeast* à des valeurs expérimentales de production de métabolites extracellulaires.

Lors d'une étude portant sur l'effet de la source d'azote sur la production de glycérol d'une souche *S. cerevisiae* industrielle, Albers et al. (1996) ont déterminé les cinétiques de production des principaux métabolites au cours de la fermentation alcoolique après avoir intégré la composition de la biomasse spécifique de la souche et fixé une valeur constante de la consommation d'ATP pour la maintenance des cellules. Nous avons utilisé ce jeu de données pour prédire à l'aide de *DynamoYeast* la production d'éthanol, de CO₂ et de glycérol à partir des données de consommation de glucose et d'ATP de maintenance, de production d'acétate, de succinate et de pyruvate. Les prédictions du modèle sont en accord avec les mesures réalisées par les auteurs, ce qui a permis de valider la topologie du réseau pour la description du métabolisme fermentaire de la levure (**Figure 25B**). Notons ici, que le réseau considéré dans *DynamoYeast* est plus détaillé que celui considéré par Albert et al (1997). Les prédictions que nous avons réalisées prennent donc en compte de la compartimentation mitochondriale, qui ne modifie pas drastiquement leur conclusion. L'avantage du modèle est qu'à partir des données des principaux métabolites extracellulaires, de la composition de biomasse et la quantité de biomasse (poids sec), nous avons pu obtenir une distribution des flux de l'ensemble du métabolisme carboné central en accord avec les données.

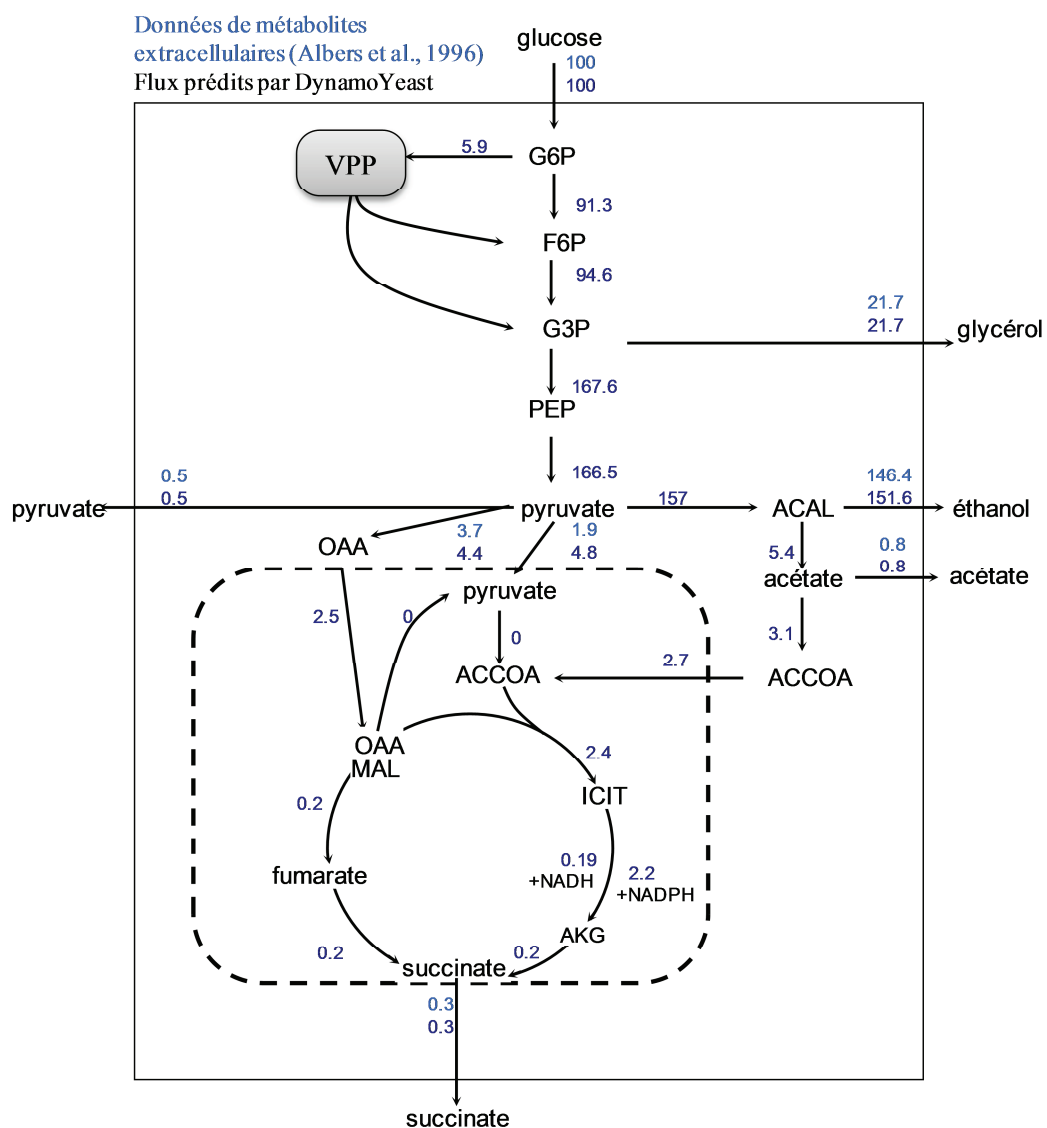


Figure 26 : Distribution des flux prédits par DynamoYeast dans le métabolisme carboné central à partir des données de métabolites extracellulaires produites par Albers et al. (1996)

III-3 Comparaison avec les données produites à partir d'un modèle

MFA

Nous avons ensuite confronté les prédictions de distribution de flux intracellulaires faites par *DynamoYeast* par une approche de FBA et celles obtenues par le modèle MFA développé par Nissen et al. (1997), à partir de données obtenues en culture continu, en anaérobiose et en limitation carbonée (glucose) (Nissen et al., 1997). En utilisant le même type de contraintes qui ont été utilisées dans cette étude, nous avons obtenu un ensemble de flux proches des flux estimés par Nissen et al. (1997) (**Figure 27**). Les deux méthodes FBA et MFA ont en commun d'exploiter le même type de contraintes. On sait par ailleurs que si le nombre de contraintes imposées au réseau métabolique est suffisamment important alors la méthode FBA retrouve la solution obtenue par les MFA.

III-4 Validation sur une souche œnologique : EC1118 et comparaison avec les résultats de ^{13}C flux

En dernier lieu, les données prédites par *DynamoYeast* ont été confrontées à des données obtenues par l'approche MFA- ^{13}C flux.

Les données de ^{13}C flux sont estimées par un modèle basé sur le réseau métabolique décrit par Gombert et collaborateurs (Gombert et al., 2001) et contraint à la fois par des données de flux vers les métabolites excrétés et la biomasse, et par des données de marquage isotopique des acides aminés. La distribution des flux déterminée par MFA- ^{13}C flux au cours de fermentations de la souche œnologique EC1118 a été comparée à celle prédite par *DynamoYeast* en utilisant le même jeu de données expérimentales pour contraindre le réseau (**Figure 28**). Les deux répartitions du flux carboné dans le réseau métabolique sont similaires pour la grande majorité des réactions.

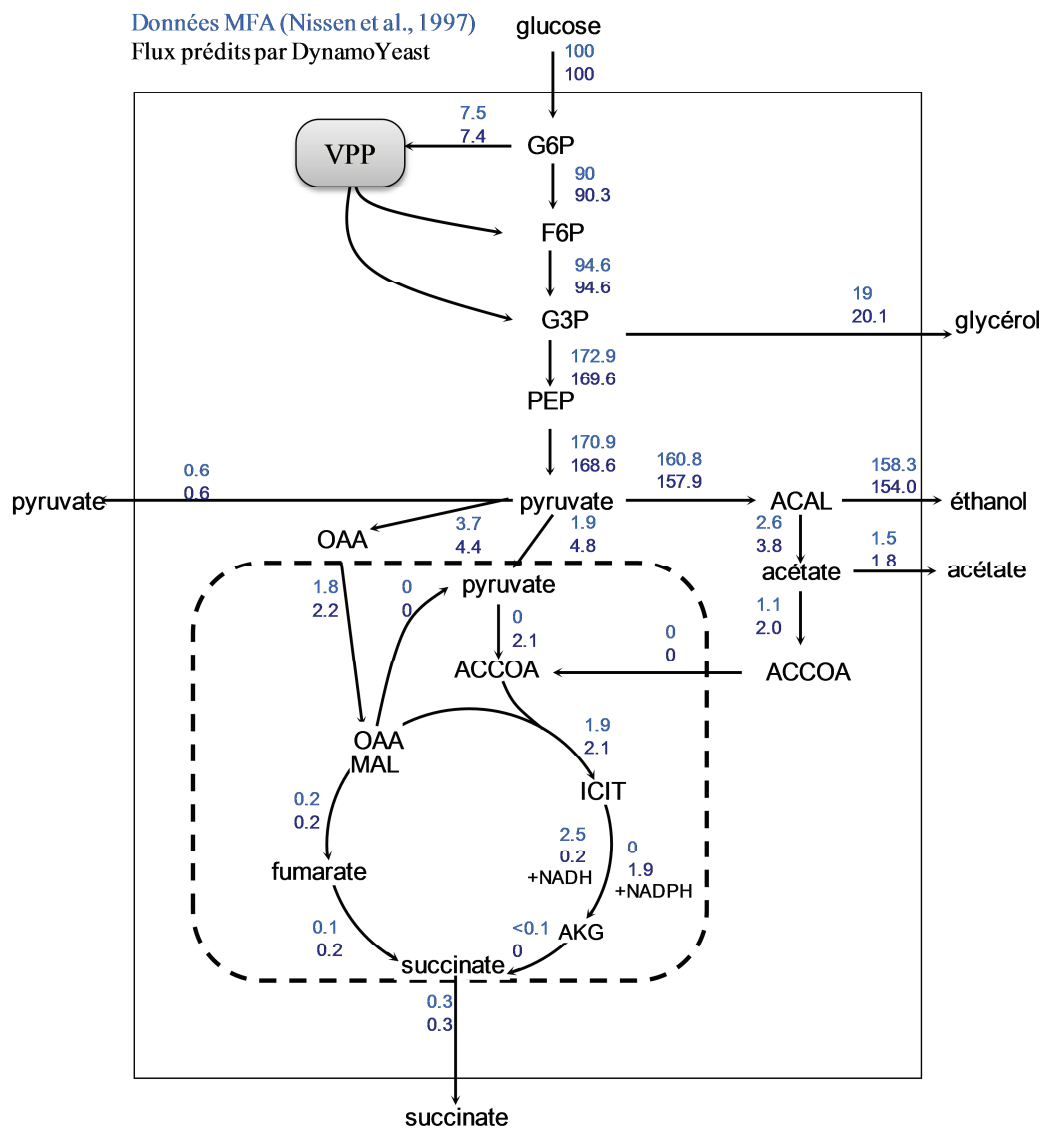


Figure 27 : Comparaison entre la distribution des flux basés sur l'approche MFA de Nissen et al. (1997) et les données prédites par le modèle *DynamoYeast* en conditions d'anérobioses où le glucose est limité

Une différence est observée située au niveau de l'estimation du flux passant par la VPP. En effet, les données ^{13}C estiment à 11 % du flux glycolytique le flux allant vers la VPP alors que *DynamoYeast* le prédit à 3.5 %. Cette divergence peut être expliquée par le fait que *DynamoYeast* calcule le flux au travers de la VPP de façon à satisfaire de façon optimale les besoins anaboliques de la levure en NADPH alors que le flux de 11% calculé par l'analyse ^{13}C -flux, conduit à une surproduction de NADPH vis-à-vis des besoins anaboliques (plus du double). Comme nous l'avons mentionné dans l'exposé bibliographique (§II-4.1.1), cette incohérence est souvent constatée dans la littérature et reste à ce jour sans réelle réponse. Cela pourrait indiquer que des voies métaboliques de consommation de NADPH ou de conversion de NADPH en NADH n'ont pas été considérées dans le réseau initial de *DynamoYeast* (chapitre II).

IV- Détermination de la consommation des cofacteurs par les voies de synthèse de la biomasse

Un élément central du contrôle redox de la cellule est la consommation des cofacteurs par la synthèse de précurseurs utilisés pour la formation de biomasse. Nous avons donc réalisé une décomposition des besoins en cofacteurs dans les différentes voies de biosynthèse de ces précurseurs. Cette analyse nous a notamment permis d'évaluer quelle pouvait être l'incidence de variations dans la composition de biomasse sur les besoins énergétiques et redox de la cellule.

Données ^{13}C flux EC1118 (Cadière et al., 2011)

Flux prédits par DynamoYeast

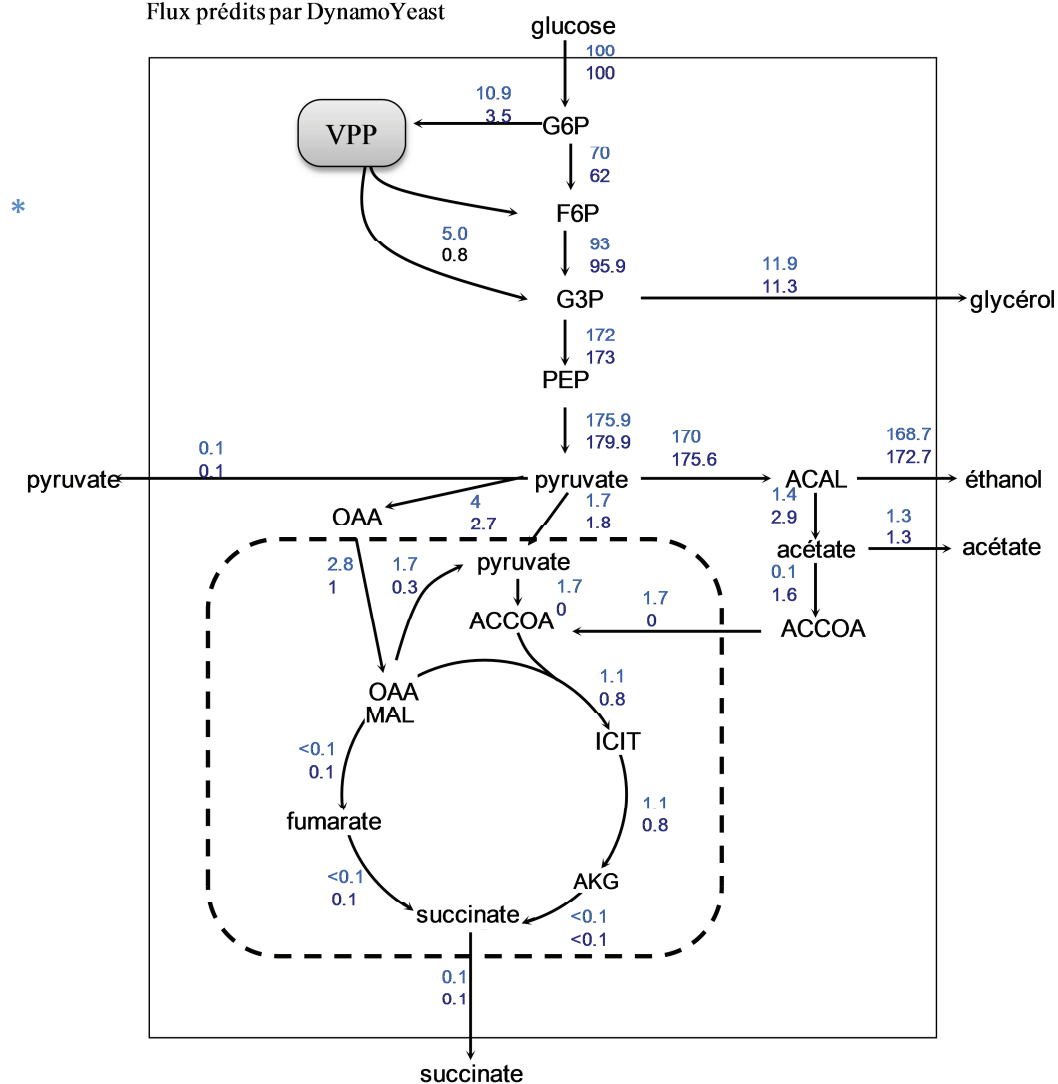


Figure 28 : Comparaison entre les données expérimentales de ^{13}C flux de la souche œnologique EC1118 (Cadière et al., 2011) et les données prédites par le modèle *DynamoYeast*

IV-1 Variabilité de la composition de la biomasse

La détermination de la composition de la biomasse est une étape importante pour l'analyse du métabolisme d'un organisme, car elle contraint fortement les bilans en cofacteurs. Les données de littérature montrent une grande variabilité de la composition de la biomasse en macromolécules selon la souche et les conditions de culture. Les variations les plus importantes sont observées au niveau de la teneur en carbohydrates des levures (**Tableau 18**).

La composition est généralement normalisée par rapport au gramme de poids sec et exprimée en mmol par gramme de poids sec ("Dry Weight") noté mmol.gDW^{-1} . Une analyse plus détaillée de la composition de biomasse est présentée dans le fichier additionnel 2 du **chapitre II (supplementary file 2 Table S2.2)**.

IV-2 Analyse globale des bilans redox pour la formation des précurseurs de la biomasse

L'objectif de cette analyse est de décomposer de façon systématique et détaillée la consommation et la production des différents cofacteurs et en particulier de déterminer la quantité des adénines nicotamides dinucléotides consommée pour la synthèse de chaque composant de la biomasse à partir du glucose. Les formules générales permettant de calculer les bilans à partir de la composition en macromolécules des souches ont été développés, en considérant que les précurseurs R5P et E4P sont synthétisés exclusivement via la VPP alors que les autres précurseurs sont formés au niveau de la glycolyse.

La **Figure 29** présente le récapitulatif des bilans associés à la souche 59A, en séparant les bilans liés au cytosol et à la mitochondrie. 89 % du NADH cytosolique provient de la synthèse des acides aminés (protéines), 11 % de la synthèse des ADN et ARN, 0,13 % de la synthèse des lipides (**Figure 29A**).

Contenu cellulaire (% g/g)	BdhNADPH, Souche cénologique	Verduyn et al., 1991	Gombert et al., 2001	Pizarro et al., 2002	Frick et Wittmann, 2005	Nookaew et al., 2008
Carbohydrates	54,0	37,5	27,0	54,7	37,2	40,7
Lipides	3,7	3,5	7,0	2,6	7,0	2,9
Protéines	31,0	47,0	51,0	37,2	41,5	46,1
ADN	6,0	7,0	11,0	5,0	6,3	6,3
ARN	0,4	0,0	0,6	0,6	0,6	0,4
Minéraux (cendres)	5,0	5,0	5,6	0,0	7,4	5,0

**Tableau 14 : Variabilité de la composition de la biomasse
entre différentes souches sur différents milieux**

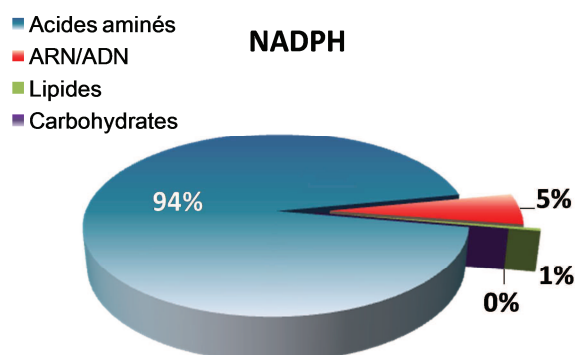
(A)	mmol.gDW ⁻¹	NADH	NADPH	ATP
	Acides aminés	4.213	-4.242	-2.967
	ARN/ADN	0.542	-0.225	-1.745
	Acides gras	-0.002	-0.018	-0.218
	Carbohydrates	0.000	0.000	-4.041
	TOTAL	4.753	-4.485	-8.971

(B)	mmol.gDW ⁻¹	NADH_m	NADPH_m	ATP_m
	Arginine		-0.106	-0.106
	Isoleucine		-0.114	
	Leucine	0.176	-0.176	
	Valine		-0.207	
	TOTAL	0.176	-0.602	-0.106

**Figure 29 : Quantités de NADH produits et NADPH et ATP (+) consommés (-) lors de la
synthèse des composés de la biomasse**

La compartimentation des cofacteurs a été prise en compte (cytosol (A) et mitochondrie (B)). A partir de la composition de biomasse de notre souche d'étude Bdh-NADPH (la composition de biomasse détaillée est indiquée dans le chapitre II, supplementary file 2, Table S2.2). Les valeurs sont reportées en (en mmol par gramme de poids sec).

(A)



(B)

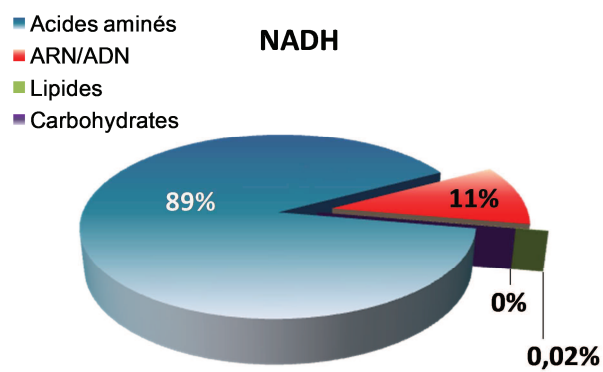


Figure 30 : Quantité de NADPH consommé (A) et de NADH produit (B) par les réactions de synthèse des principaux composants de la biomasse (acides aminés, carbohydrates, ARN, ADN et lipides) pour la souche Bdh-NADPH

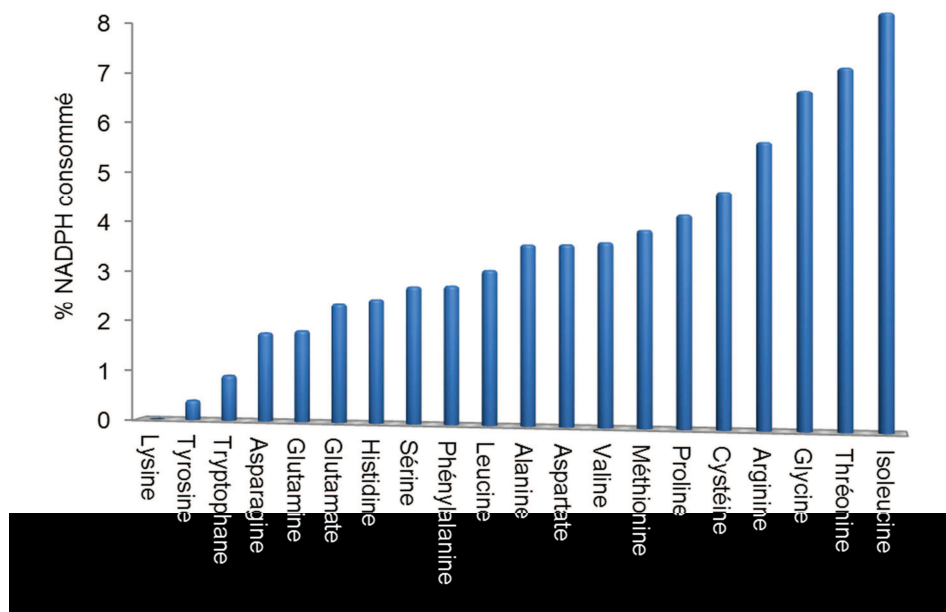


Figure 31 : Consommation relative de NADPH par les acides aminés

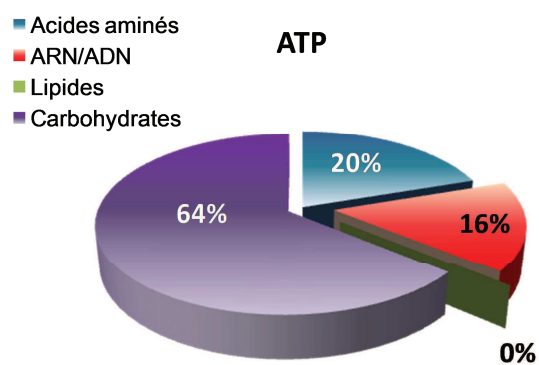


Figure 32 : Répartition de la quantité d'ATP consommée par les réactions de synthèse des principaux composants de la biomasse (acides aminés, carbohydres, ARN, ADN).

Le NADPH cytosolique est très majoritairement consommé (94 %) par les voies de synthèse des acides aminés, alors que seulement 5 % du NADPH est utilisé pour la synthèse des purines et des pyrimidines et 1 % pour la formation des lipides (**Figure 29B**). La synthèse des carbohydrates n'intervient pas dans l'équilibre des balances du NADPH/NADP⁺ et du NADH/NAD⁺.

Il apparaît d'après ces données, que les variations dans la teneur en protéines des souches (entre 31 et 56 %, **Tableau 18**) peuvent générer des différences significatives dans les besoins anaboliques en NADPH des levures et en conséquence, avoir un effet sur la distribution du flux dans le métabolisme carboné central.

La souche Bdh-NADPH contient une forte proportion de carbohydrates au détriment des protéines. Ainsi, les besoins anaboliques en NADPH de cette souche sont moindres, par rapport aux autres levures.

La répartition de la demande en NADPH pour la synthèse de chaque acide aminé a ensuite été analysée (**Figure 30**). L'isoleucine, la thréonine et la glycine sont les acides aminés les plus consommateurs de NADPH. Les besoins en NADPH de la souche 59A pour assurer la synthèse de méthionine, dont la synthèse requiert 7 moles de NADPH par mole de méthionine, sont moins importants du fait de la faible proportion de cet acide aminé dans la cellule (0,032 mmol.gDW⁻¹) (**Figure 31**).

L'analyse des bilans relatifs à la consommation d'ATP montre que, contrairement au NADPH et au NADH, la synthèse des carbohydrates contribue à la majorité de la consommation d'ATP cytosolique dédiée à la synthèse de la biomasse (64 %) (**Figure 32**). La synthèse des acides aminés et de l'ADN et de l'ARN nécessite approximativement la même quantité, respectivement, 20 et 16 % (**Figure 32**). Les voies de synthèse des lipides ne consomment pas d'ATP.

IV-3 Analyse de la production et de la consommation d'ATP

L'ATP est un cofacteur associé à de nombreux processus cellulaires et il est difficile d'établir un bilan quantitatif concernant sa consommation par la levure au cours de la fermentation.

L'ATP est utilisé en tant que source d'énergie dans de nombreux processus cellulaires, comme l'assemblage des macromolécules, la charge des ARNs de transfert, la traduction des protéines : cette consommation d'ATP, généralement définie comme ATP de maintenance, reste difficile à quantifier, et a été fixée dans le modèle à 69,2 mmol/gDW (Famili et al., 2003).

Une part de l'ATP produit par la cellule est utilisée pour la formation des précurseurs nécessaires à la synthèse cellulaire et peut être estimée à partir de la connaissance de la composition de la biomasse.

Par contre, la consommation de l'ATP associé aux processus de transport entre le milieu et le cytosol et entre différents compartiments est difficile à estimer. Nous avons considéré un coût énergétique de 2 mol ATP / mol d'acide organique exporté du cytoplasme dans le milieu : les acides organiques sont présents sous forme dissociée dans le cytoplasme (Stein, 1981) et il est nécessaire d'exporter à la fois la forme dissociée de l'acide (Verduyn et al., 1990) et le proton qui lui est associé pour le maintien l'homéostasie cellulaire.

D'autre part, le transport des acides organiques entre cytoplasme et mitochondrie est associé, de façon directe ou indirecte, à un import de proton dans la mitochondrie, générant une acidification de ce compartiment. Afin de contrôler le pH mitochondrial, les protons sont exportés par l'ATP-ase mitochondriale (Conway and O'Malley, 1946). Pour prendre en compte cette consommation, un coût énergétique de 1 mole ATP / mole d'acide organique a été intégré dans *DynamoYeast*.

En dernier lieu, la cible principale de l'éthanol est la membrane plasmique, sa fluidité étant altérée au cours du stress éthanol. Cette altération modifie la perméabilité aux ions, en particulier aux protons générant une entrée de protons et une acidification intracellulaire (Cartwright et al. 1986). Nous avons modélisé et intégré dans *DynamoYeast* (**Chapitre II**), l'augmentation de la demande en ATP liée aux modifications de la perméabilité membranaires par l'accumulation d'éthanol.

CHAPITRE II :

**ANALYSE A L'AIDE D'UN MODELE A
BASE DE CONTRAINTES DES
CONSEQUENCES METABOLIQUES
D'UNE AUGMENTATION DE
L'OXYDATION DU NADPH CHEZ
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

Chapitre II : ANALYSE A L'AIDE D'UN MODELE A BASE DE CONTRAINTES DES CONSEQUENCES METABOLIQUES D'UNE AUGMENTATION DE L'OXYDATION DU NADPH CHEZ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Les travaux présentés dans ce chapitre avaient pour objectifs (i) d'identifier les stratégies mises en place chez la levure pour assurer le maintien de l'équilibre de la balance NADPH/NADP⁺ et (ii) de quantifier la contribution des voies impliquées.

Les approches précédemment développées pour étudier le métabolisme NADPH ont été basées sur des approches génétiques locales, ou plus globales, reposant sur des perturbations du ratio [NADPH]/[NADP⁺] par ajout d'accepteur d'électron (**Exposé bibliographique §II-6.2**).

Pour modifier spécifiquement le NADPH, nous avons utilisé dans cette étude un système expérimental original combinant l'expression d'une enzyme NADPH dépendante, la butanediol déshydrogénase (BDH) dont la préférence pour le cofacteur a été modifiée par mutagenèse dirigée (Ehsani et al., 2009) et l'addition d'acétoïne, un accepteur d'électrons.

Ce système pouvait présenter différents avantages :

- L'enzyme Bdh1 NADPH dépendante, obtenue précédemment au laboratoire en modifiant trois acides aminés au niveau du site de liaison du cofacteur, présente une forte affinité pour le NADPH ($K_m = 44 \mu M$) et aucune pour le NADH; la spécificité du cofacteur de la BDH a été complètement changée. Nous pouvions donc espérer par ce système modifier de façon spécifique le ratio intracellulaire NADPH/NADP⁺. D'autre part, en comparant l'effet de la surexpression de cette forme et de la forme native, il était possible de comparer l'effet de l'oxydation du NADPH et du NADH.

- Par ajout d'une concentration progressive d'acétoïne, il devait être possible d'imposer une demande en NADPH de plus en plus forte à la levure. Il s'agit donc d'un système relativement souple.

- La réaction acétoïne-butanediol se trouvant en bout de chaîne métabolique (le 2,3-butanediol est excrété et n'est pas métabolisé), on pouvait espérer minimiser les risques d'effets métaboliques secondaires liés à l'addition de l'acétoïne.

- Par mesure de l'acétoïne restante et du butanediol produit, la quantité de NADPH consommée est connue et la perturbation NADPH peut être quantifiée.

Enfin nous avons émis l'hypothèse que la surexpression des gènes *BDHI* natifs et modifiés permettrait d'obtenir une consommation plus efficace de l'acétoïne, et ainsi d'augmenter l'intensité de la perturbation.

Nous décrivons dans ce chapitre les résultats de notre étude, qui a été conduite en trois étapes :

- la mise au point des conditions expérimentales, l'analyse de la spécificité du système de perturbation et la quantification des perturbations obtenues

- l'étude de l'effet de différents niveaux de perturbation sur la biomasse et sur la synthèse des principaux sous-produits fermentaires.

- une analyse systématique des données obtenues à l'aide du modèle DynamoYeast décrit au chapitre I, basée sur la réconciliation des données expérimentales avec les contraintes carbone et redox du réseau métabolique.

Cette approche nous a permis de mieux comprendre comment la levure adapte ses flux métaboliques pour répondre à la demande NADPH.

A constraint-based model analysis of the metabolic consequences of increased NADPH oxidation in *Saccharomyces cerevisiae*

Magalie Celton^{1,2}, Anne Goelzer², Carole Camarasa¹, Vincent Fromion², Sylvie Dequin^{1§}

¹INRA, UMR1083, Sciences Pour l'Oenologie, 2 Place Viala, F-34060 Montpellier, France

² MIG, INRA, domaine de Vilvert, F-78350 Jouy-en-Josas, France

[§]Corresponding author

Email addresses:

MC: celton@supagro.inra.fr

AG: anne.goelzer@jouy.inra.fr

CC: camarasa@supagro.inra.fr

VF: vincent.fromion@jouy.inra.fr

SD: dequin@supagro.inra.fr

Abstract

Controlling the amounts of redox cofactors to manipulate metabolic fluxes is emerging as a useful approach to optimizing byproduct yields in yeast biotechnological processes. Redox cofactors are extensively interconnected metabolites, so predicting metabolite patterns is challenging and requires in-depth knowledge of how the metabolic network responds to a redox perturbation. Our aim was to analyze comprehensively the metabolic consequences of increased cytosolic NADPH oxidation during yeast fermentation. Using a genetic device based on the overexpression of a modified 2,3-butanediol dehydrogenase catalyzing the NADPH-dependent reduction of acetoin into 2,3-butanediol, we increased the NADPH demand to between 8 and 40-fold the anabolic demand. We developed (i) a dedicated constraint-based model of yeast fermentation and (ii) a constraint-based modeling method based on the dynamical analysis of mass distribution to quantify the *in vivo* contribution of pathways producing NADPH to the maintenance of redox homeostasis. We report that yeast responds to NADPH oxidation through a gradual increase in the flux through the PP and acetate pathways, providing 80 and 20% of the NADPH demand, respectively. However, for the highest NADPH demand, the model reveals a saturation of the PP pathway and predicts an exchange between NADH and NADPH in the cytosol that may be mediated by the glycerol-DHAP futile cycle. We also reveal the contribution of mitochondrial shuttles, resulting in a net production of NADH in the cytosol, to fine-tune the NADH/NAD⁺ balance. This systems level study helps elucidate the physiological adaptation of yeast to NADPH perturbation. Our findings emphasize the robustness of yeast to alterations in NADPH metabolism and highlight the role of the glycerol-DHAP cycle as a redox valve, providing additional NADPH from NADH under conditions of very high demand.

Keywords: NADPH oxidation, constraint-based modeling, redox cycles.

1. Introduction

Over the last 20 years, metabolic engineering has been extensively used to develop novel *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains with optimized product yields for various fermentation processes. Obtaining the ideal combination of byproducts is often challenging, particularly when rerouting the central carbon metabolism which is, inherently, coupled to energy and redox processes. The pyridine nucleotides, NADH and NADPH, are central to redox metabolism and are highly connected metabolites participating in more than 300 reactions in *S. cerevisiae* (Forster et al., 2003). Consequently, any change of their intracellular concentration leads to numerous diverse effects in the metabolic network, resulting in unpredictably altered metabolite patterns (Remize et al., 2003; Heux et al. 2006, Ehsani et al, 2009b).

Excess NADH is generated by the assimilation of sugars to biomass and the production of various metabolic end products, including acetic acid, succinic acid and pyruvic acid (Oura, 1977). In the absence of oxygen, the formation of NADH is balanced by the formation of glycerol: synthesis of glycerol from glucose results in the oxidation of 1 mol NADH per mol of glycerol.

NADPH primarily drives anabolic reactions, and many reactions involved in the biosynthesis of amino acids, lipids and nucleotides use NADP(H) as the reducing agent. The formation of biomass requires the oxidation of NADPH to NADP⁺ (about 6.5 mmol for 1 g biomass, Verduyn et al., 1990). Thus, the anabolic demand for NADPH is coupled to the rate of biomass formation, which can vary significantly with environmental conditions (Van Dijken, 1986; Bruinenberg, 1986; Cortassa et al., 1995). In addition, NADP(H) is involved in mechanisms of protection against oxidative stress, in particular in the regeneration of glutathione and thioredoxin

(Minard et al., 2005; Herrero et al., 2008). In glucose-grown yeast cells, the consumption of NADPH is primarily balanced in the cytosol by the reduction of NADP⁺ in the oxidative branch of the pentose phosphate pathway (PP pathway), through the reactions catalyzed by the glucose-6-phosphate dehydrogenase Zwf1p and the 6-phosphogluconate dehydrogenase Gnd1p. The reaction catalyzed by the NADP⁺-dependent acetaldehyde dehydrogenase Ald6p, the major isoform during fermentative metabolism (Saint-Prix et al., 2004), is important as the second source of cytosolic NADPH. Indeed, a double *zwf1 ald6* mutant is unable to grow on glucose due to its inability to reduce NADP⁺ (Grabowska and Chelstowska, 2003).

Hydrogen can be transferred between the co-enzyme systems of NADH/NAD⁺ and NADPH/NADP⁺ in several organisms by the enzyme pyridine nucleotide transhydrogenase, but the lack of transhydrogenase-like activities has been reported in *S. cerevisiae* (Bruinenberg et al, 1983). In this yeast, NAD(H) kinases or coupled reactions in which NADH and NADP⁺ are converted into NADPH and NAD⁺ may result in exchange between nucleotide cofactors. For example, the reactions catalyzed by two mitochondrial isocitrate dehydrogenases or by the NAD⁺- and NADP⁺-dependent acetaldehyde dehydrogenases may act as a redox shunt between the two co-factor systems (Sazanov and Jackson, 1994; Nissen et al, 2001, Bakker et al., 2001).

Several investigations of the impact of NADH perturbation, or the consequences of the expression of a nucleotide transhydrogenase, have been reported (Heux et al., 2006; Hou et al., 2009; Anderlund et al., 1999; Nissen et al., 2001). However, there are no reports that describe the effects of specifically decreasing NADPH abundance in *S.*

cerevisiae. We therefore evaluated the *in vivo* contribution of the NADPH-generating pathways according to the demand for NADPH. Acetoin, which is reduced to 2,3-butanediol by the yeast NADH-dependent butanediol dehydrogenase Bdh1p (Gonzalez et al., 2000) can be used as a source of additional reducing power in *S. cerevisiae* (Roustan and Sablayrolles, 2002; Valadi et al., 2004). To manipulate NADPH metabolism, we overexpressed a NADPH-dependent modified Bdh1p enzyme; this enzyme was previously obtained by site-directed mutagenesis of three adjacent amino acid residues in the NADH binding site, resulting in a complete shift of cofactor specificity (Ehsani et al., 2009a). This modified enzyme has the same apparent affinity (K_m value) for NADPH as the native Bdh1p for NADH (45 μ M and 44 μ M respectively). Since acetoin is not used as carbon source and is efficiently converted into 2,3-butanediol, which is excreted into the medium, it can be used as an additional substrate for the generation of NADP^+ to study the effect of increased NADPH oxidation.

We determined the metabolic profile and growth characteristics of a *S. cerevisiae* strain overexpressing the NADPH-dependent modified Bdh1p enzyme grown in the presence of various acetoin concentrations. We then developed a reduced stoichiometric model of yeast fermentation and used a dedicated constraint-based modeling approach, named dynamic Mass Balanced Analysis (dMBA), predicting the mass distribution over all time points of fermentation to explore the metabolic changes balancing the increased NADPH consumption.

Our findings reveal that *S. cerevisiae* responds robustly to perturbations of between 8 and 40-fold in the NADPH demand for anabolism. The predictions of the model highlight three points: (1) the contribution of mitochondrial shuttles resulting in the net production of NADH in the cytosol, explaining the production of a

glycerol surplus with respect to the anabolic demand; (2) the major contributions of the PP and, to a lesser extent, acetate pathways to providing NADPH in response to increased NADPH demand; and (3) the saturation of the PP pathway at high levels of NADPH oxidation, leading to reducing equivalents being transferred from NADH to NADPH at the expense of ATP by means of the glycerol-DHAP cycle.

2. Material and methods

2.1. Yeast strain construction and culture conditions

The *S. cerevisiae* yeast strains used in this study (Table 1) were generated from the strain 59A (*MATa*), a haploid derivative of the wine yeast strain EC1118 (Ambroset et al., 2011). *S. cerevisiae* strains were grown in YPD medium (1% Bacto yeast extract, 2% Bacto peptone, 2% glucose). The *BDH1*_{221,222,223} gene encoding a butanediol dehydrogenase able to use NADPH instead of NADH was previously obtained by directed mutagenesis of three amino acids in the coenzyme binding site of Bdh1p (Ehsani, et al., 2009a). Strains V5ald6 *BDH1*_{221,222,223} and V5ald6 *BDH1*, overexpressing the mutated and native *BDH1* genes, respectively, were previously obtained by replacing the native promoter *in situ* with the promoter of the yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase *TDH3* (Ehsani, et al., 2009b). DNA was extracted from these two strains and purified by standard protocols (Sambrook et al., 1989), and was used as the template to amplify a fragment carrying the *loxP-kanMX4-loxP* and *TDH3* promoter cassettes.

Oligonucleotides were synthesized by MWG Biotech (MWG, Germany): the forward primer 5'-CGGAGAGAAGAAACCGGTG-3', corresponding to a region upstream from

the BDH1 (or *BDH1*_{221,222,223}) ORF start codon, and the reverse prime 5'-GCAGAACTTACTTCTGTCTG-3'corresponding to a region downstream from the start codon of the *BDH1* (or *BDH1*_{221,222,223}) ORF. The amplified fragments were used to transform 59A by the LiAc procedure (Schiestl and Gietz, 1989). Transformants were selected on YPD medium containing 200 mg/ml geneticin, and the strains NADH-Bdh and NADPH-Bdh, overexpressing Bdh1p and Bdh1p_{221,222,223} respectively were isolated.

The integration of the two cassettes and correct substitution of the native *BDH1* gene were checked by PCR.

Strains	Expression cassette	Reference
59A	--	INRA UMR 1083
NADH-Bdh	<i>TDH3p-ald6-BDH1</i>	This study
NADPH-Bdh	<i>TDH3p-ald6-BDH1</i> _{221,222,223}	This study

Table 1. *Saccharomyces cerevisiae* strains used in this study.

2.2. Enzyme activity assays

Yeast cell extracts were prepared from aliquots of 1×10^9 cells. BDH activity was determined immediately at 25°C by monitoring the change in absorbance at 340 nm, using a Cary 400 Bio (Varian) spectrophotometer. One unit of activity corresponds to 1 μmol of NADH or NADPH consumed per minute, based on an extinction coefficient of $6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 340 nm. The reduction assays were performed in 33 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), 0.5 mg/L BSA, 50 mM acetoin and 0.2 mM NAD(P)H. The reaction was started by the addition of 20 μl of crude extract, diluted 1/20. Protein concentrations were determined with a BC Assay kit (Uptima-Interchim, France).

2.3. Sensitivity to hydrogen peroxide

For drop-test assays, exponential phase cells were pelleted and resuspended in H₂O at OD₆₀₀ 1.0. Cells were serially

diluted in 10-fold steps, and 10 μl of each dilution was spotted onto control SD minimal medium (1.34 % yeast nitrogen base with ammonium sulfate, 10 % glucose), containing 100 mM acetoin and 1 to 3 mM hydrogen peroxide.

2.4. Fermentation conditions

Batch fermentations were performed in 300 mL flasks equipped with fermentation locks to maintain anaerobiosis, at 28°C, with permanent stirring (500 rpm). Fermentation experiments were carried out in SD minimal medium (1.34 % yeast nitrogen base with ammonium sulfate, 10 % glucose). To fulfill the lipid requirements of yeast cells during anaerobic growth, SD minimal medium was supplemented with 1.25 mg/L ergosterol, 0.164 g/L Tween 80, and 0.35 mg/L oleic acid. Acetoin was added to the media to the required concentration at the beginning of the fermentation. The stock solution (1.5 M) was prepared from commercial acetoin and stored at 4°C (ref. A17951, Sigma-Aldrich). Cells were precultured at 28°C in 50-ml flasks with agitation (150 rpm) and used to inoculate the fermentor at OD_{600nm} 0.05. Fermentation experiments were performed in triplicate.

2.5. Analytical techniques

Cell dry weight was measured by filtering 50 mL of the culture through a pre-weighed 0.45 μm pore-size nitrocellulose filter (Millipore). The filters were washed twice with 50 ml distilled water and dried for two days at 105°C.

Growth was estimated by following the optical density at 600 nm using a spectrophotometer, or by counting cells using an electronic particle counter (Coulter-Counter Coultronics, ZBI model). Glucose, glycerol ethanol, pyruvate, succinate, acetate, and 2-ketoglutarate were analyzed by high-pressure liquid chromatography (HPLC 1100, Agilent Technologies) using an HPX-87H ion exchange column (Bio-Rad®). Dual

detection was performed with a refractometer and a UV detector (Hewlett Packard). The concentrations of acetoin and 2,3-butanediol were measured by gas chromatography (GC). Acetoin and 2,3-butanediol were extracted into chloroform according to Hagenauer-Hener et al. (1990) with the following modifications: 1 mL internal standard (hexanol, 1:1000 v/v) in 10 % ethanol was added to 1 mL of sample. The organic phase was dried and injected into 30 m megabore column (DBWAX, J&W Scientific) on a GC apparatus HP 6890. Concentrations of acetaldehyde and other volatile aromatic compounds were determined by GC using apparatus equipped with a headspace injector. Carbon compounds were concentrated in a cold trap (Tenax TM) for 6 minutes, injected into a ZBWax (60 m x 0.32 mm x 0.5 μ m) column supplied by Phenomenex Inc. at a pressure of 120 kPa with the following temperature profile: 38 °C for 3 min, increasing by 3°C.min⁻¹ to 65°C, and then by 6°C.min⁻¹ to 160°C, with the temperature kept constant at 160°C for 5 min and then increasing by 8°C.min⁻¹ to 230°C, at which it was maintained for 5 min. Flame ionization detection (FID) was used. For standardization of the equilibrium conditions between the liquid and the headspace, the ethanol concentration in the sample was fixed at 11%.

2.6. Analysis of cellular components and composition

Cells samples (10 mg) were harvested, washed twice with water and treated with DMSO (50 % vol:vol, 1h, 100 °C). The proteins extracted were quantified with a BC Assay kit (Uptima-Interchim, France). For amino acid determinations, proteins (1 mg dry weight) were hydrolyzed by incubation for 24 h at 110°C in 6 N HCl. Norleucine (500 nmol/L) was added to the samples as an internal standard. For sulfur-containing amino acids, samples were first oxidized in 88 % performic acid. Amino-acid compositions were determined by

HPLC with cation exchange resin (Biochrom 30) with post column derivatization with nihydriin. Lipid contents were determined by weighing before and after two successive extractions with chloroform/methanol (1/2, (v/v)) as described previously (Bligh and Dyer, 1959). Carbohydrate contents were measured by the method of Herbert (Herbert, 1971). Five mL of sulfuric acid and 1 mM phenol (5 g/L) were added to 1 mL of sample (biomass 1.6 g/L). The absorbance at 488 nm was measured after a 30 min incubation at room temperature to quantify carbohydrate content as described previously (Lange and Heijnen, 2001).

2.7. Theoretical calculation of glycerol production

Assuming that the production of glycerol mainly corresponds to the amount of NADH produced for the synthesis of biomass and byproducts, the theoretical glycerol production to balance the NADH excess can be determined as follows (details are given in supplementary file 3):

$$\text{NADH produced} = \sum \alpha_i^{\text{NADH}} \times q_i^{\text{byproducts}} + \sum \beta_i^{\text{NADH}} \times q_i^{\text{biomass}}$$

α_i^{NADH} : stoichiometric coefficient of NADH in the i -th reaction for byproducts synthesis.

β_i^{NADH} : stoichiometric coefficient of NADH in the i -th aggregated reactions for biomass synthesis

q_i^y : Amount of mass (in mmol/gDW) related to the i -th reaction belonging to the y -th metabolic pathway (byproducts or biomass).

The production of cytosolic NADH for biomass synthesis is equal to:

$$q^{\text{biomass}} = 4.8 \text{ mmol/gDW (supplementary file 3, Table S3.1)}$$

We assumed that the biomass composition is independent of the acetoin perturbation.

The byproducts are α -ketoglutarate, acetate, pyruvate and 2,3-butanediol (endogenous production).

Under conditions without perturbation (no acetoin addition), the production of acetate, pyruvate, butanediol and α -ketoglutarate are:

$$\begin{aligned} q^{acetate} &= 2.16 \text{ mmol/gDW}, \\ q^{pyruvate} &= 0.27 \text{ mmol/gDW}, \\ q^{butanediol} &= 0 \text{ mmol/gDW and} \\ q^{\alpha\text{-ketoglutarate}} &= 0.03 \text{ mmol/gDW} \end{aligned}$$

The theoretical production of glycerol is then equal to the total production of cytosolic NADH (7.21 mmol/gDW).

For the largest NADPH perturbation (addition of 400 mM acetoin), the production of acetate, pyruvate, butanediol and α -ketoglutarate are:

$$\begin{aligned} q^{acetate} &= 22.02 \text{ mmol/gDW}, \\ q^{pyruvate} &= 0.70 \text{ mmol/gDW}, \\ q^{butanediol} &= 0 \text{ mmol/gDW and} \\ q^{\alpha\text{-ketoglutarate}} &= 0.1 \text{ mmol/gDW} \end{aligned}$$

The theoretical production of glycerol for the largest NADPH perturbation is equal to 27.57 mmol/gDW.

2.8. Reconciliation of the model with the data: dynamic Mass Balanced Analysis

The stoichiometry matrix associated with the *DynamoYeast* model describes the stoichiometry of each chemical reaction included in the metabolic network. Contrary to other standard constraint-based methods such as Metabolic Flux Analysis method (Vallino and Stephanopoulos, 1993) which computes flux distribution based on the derivation of data, our method computes mass distribution. This avoids the amplification of noise linked to experimental errors. For the reconciliation of the model with the data we developed a dedicated constraint-based modeling method which (i) reconciles the model and the whole set of data obtained for all time points of batch fermentation (10 to 14 time points) in one step (ii) smooths all extracellular metabolite data.

The extracellular metabolites amounts

were projected onto the model through the resolution of the following optimization problem over N time points:

$$\text{minimize: } \sum_{k=1}^N (\theta_k^{glc} + \theta_k^{etoh})$$

subject to:

$$\begin{aligned} A_{eq,k} M_k &= b_{eq,k} \\ A_{eq,k} M_k &\leq b_k \\ \frac{|B_k - B_k^{mes}|}{B_k^{mes}} &\leq 8\% \\ |M_k^{glc} - M_k^{glc,mes}| &\leq \theta_k^{glc} \\ |M_k^{glc} - M_k^{etoh,mes}| &\leq \theta_k^{etoh} \\ B_{k-1} &\leq B_k \end{aligned}$$

where $M_k = (M_k^{glc}, M_k^{eth}, M_k^1, \dots, M_k^n)$, $B_k, \theta_k^{glc}, \theta_k^{eth}$ for all time points $k \in \{1, \dots, N\}$ are the decision variables of the optimization problem. M_k^j and B_k are the cumulated mass in millimoles produced by the j^{th} reaction and the biomass at time k , respectively. $\theta_k^{glc}, \theta_k^{eth}$ are the absolute errors between measured and estimated amounts of glucose and between measured and estimated amounts of ethanol in millimoles, respectively. The sum of absolute values for glucose and ethanol errors (L1 norms) were then minimized over all time points of the fermentation, while the other metabolites measured (acetoin, glycerol, pyruvate, succinate, acetate, 2-oxoglutarate) were fixed in the optimization problem in $b_{eq,k}$. Compared to other norms such as the quadratic norm L2, the use of the L1 norm decreases the sensibility of the criterion to possible outliers. In addition, the production of endogenous 2,3-butanediol was set to 0 and that of biomass was set to increase $B_{k-1} \leq B_k$. Matrix A_k describes the reversibility of chemical reactions. $M_k^j \geq 0$ if the j^{th} reaction is irreversible.

The previous optimization problem is easily transformed into a Linear Programming optimization problem which can be efficiently solved (Boyd and Vandenberghe 2004; Nesterov, 2004). We solved the optimization problem by using

the CPLEX (<http://www-01.ibm.com/software/integration/optimization/cplex-optimizer/>) from Matlab 7.9.0. Since this optimization problem predicts the mass distribution for N time points, we named the method dynamic Mass Balanced Analysis (dMBA).

2.9. Estimation of the ATP consumption coefficient linked to proton influx during fermentation

We assumed that ATP consumption to maintain pH homeostasis during fermentation is directly proportional to the biomass (noted B) and to an ethanol-dependent coefficient, (noted $D(E)$ where E is the ethanol amount). At time t :

$$\frac{d \text{ATP}}{dt} = D(E(t))B(t)$$

Based on the work of Leão et al. (1984), we assumed that ATP consumption depends linearly on the ethanol concentration: $D(E(t)) = D_1 E(t) + D_0$.

This equation can be integrated by parts between 0 and t_f . By noting $B_c(t) = \int_0^t B(\tau) d\tau$ the cumulated biomass from time 0 to time t . Therefore:

$$\text{ATP}(t_f) = [D(E(t))B_c(t)]_0^{t_f} - \int_0^{t_f} \dot{D}(E(t))B_c(t) dt.$$

If D_1 is small enough, the second term can be neglected and $\text{ATP}(t_f) = D(E(t_f))B_c(t_f)$. We used *DynamoYeast* to estimate the ATP consumed for maintenance and computed the cumulated biomass B_c from the measured biomass. The coefficients D_1, D_0 were estimated by robust linear regression on Matlab 7.9.0. We verified that D_1 is small compared to D_0 .

3. Results

3.1. Genetic device for NADPH perturbation

To study the metabolic response of *S. cerevisiae* to increased NADPH oxidation, we overexpressed a NADPH-dependent

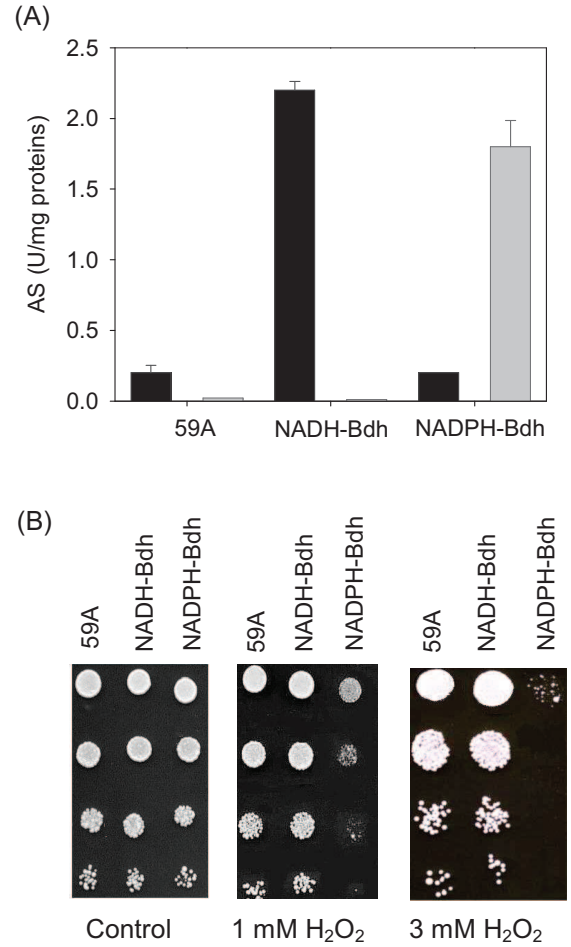


Figure 1: BDH activity and sensitivity to oxidative stress

(A) BDH specific activity of strains 59A (control) and 59A overexpressing the native (NADH-Bdh) or modified (NADPH-Bdh) BDH, determined in the presence of 20 mM of NADH (black) or NADPH (grey). (B) Growth of 59A, NADH-Bdh and NADPH-Bdh strains under oxidative stress conditions. Serial dilutions of yeast cultures were spotted onto SD medium containing 100 mM acetoin and 1mM or 3mM H₂O₂.

modified Bdhp enzyme (Ehsani et al., 2009a) in the *S. cerevisiae* strain 59A.

The modified *BDH1* gene under the control of the *TDH3* promoter was used to replace the gene encoding the native enzyme in the genome (to give strain NADPH-Bdh). Similarly, the unmodified *BDH1* gene under the control of the *TDH3* promoter was used to construct a control strain (strain NADH-Bdh). Specific BDH activities were determined during exponential growth on YPD, and were similar for strains overexpressing the

native and modified Bdh (2.2 ± 0.06 and 1.8 ± 0.1 U/mg protein, determined with NADH and NADPH, respectively) and were about 10-fold greater than the NADH-dependent acetoin-reducing activity of 59A (0.2 ± 0.05 U/mg protein) (Figure 1A). NADPH is central to the response to oxidative stress (Herrero et al., 2008; LaRoche et al., 2006), so a marked decrease in the intracellular NADPH concentration may result in an oxidative stress-sensitive phenotype. Indeed, a *zwf1* deletion strain lacking the glucose 6-phosphate dehydrogenase which catalyses the first step of the oxidative PP pathway segment that produces NADPH is oxygen-sensitive (Penninckx, 2002; Slekar et al., 1996). Therefore, we tested the growth of 59A, NADH-Bdh and NADPH-Bdh on plates containing acetoin and 0, 1 and 3 mM hydrogen peroxide (H_2O_2). The growth of NADPH-Bdh was slower than that of 59A and NADH-Bdh on YPD containing 1 mM H_2O_2 and was completely abolished on 3 mM H_2O_2 (Figure 1B). Clearly, strain NADPH-Bdh has increased sensitivity to oxidative stress, suggesting that overexpression of NADPH-Bdh enhances the *in vivo* NADPH oxidation.

3.2. Quantification of NADPH/NADH perturbation

To evaluate the perturbation caused by the NADH and NADPH-dependent Bdh system, strains 59A, NADH-Bdh and NADPH-Bdh were grown by batch fermentation on 2x SD 10 % glucose containing 0, 100, 200, 300 or 400 mM acetoin. The Bdh-overproducing strains consumed 2 to 3-fold more acetoin than the control strain 59A, regardless of the initial acetoin concentration (Figure 2A). The NADH-Bdh strain consumed two-thirds to all the acetoin when present at 100 or 200 mM, and half the initial amount at higher acetoin concentrations (300 and 400 mM) (Figure 2A). The NADH perturbation was fairly constant for acetoin concentrations

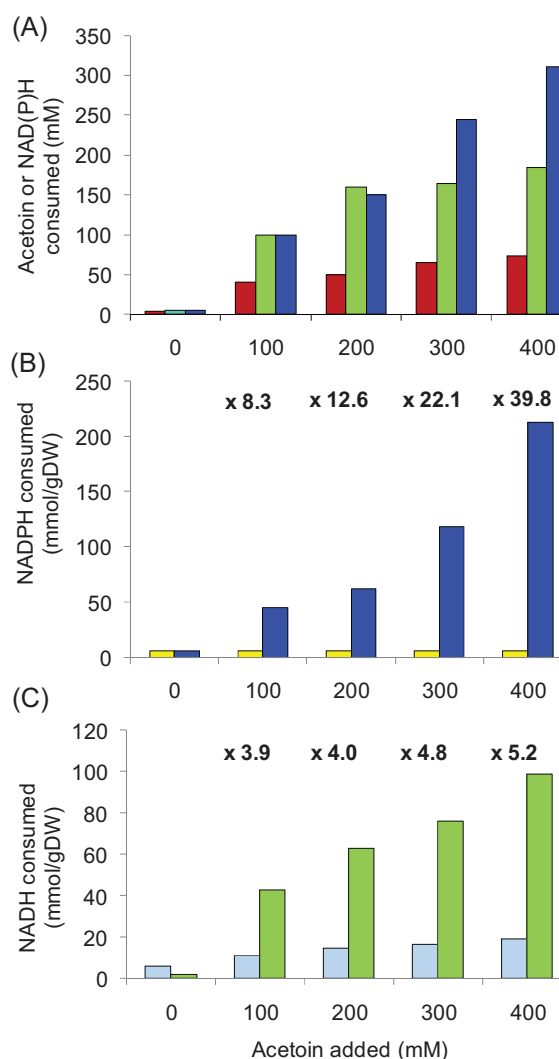


Figure 2: Quantification of the NADPH and NADH perturbations

(A) Acetoin and NAD(P)H consumed (mM) by the NAD(P)H-Bdh system as a function of acetoin added, for the strains 59A (red), NADH-Bdh (green) and NADPH-Bdh (dark blue) (B) Comparison between the amount of NADPH consumed (normalized to biomass, mmol/gDW) by the anabolic demand, determined from biomass composition (yellow), and via the NADPH-Bdh system (dark blue) (C) Comparison between the amount of NADH oxidized (normalized to biomass, mmol/gDW) by the glycerol pathway (light blue) and by the NADH-Bdh system (green).

of 200 to 400 mM; 160 to 180 mM NADH were oxidized irrespective of the amount of acetoin added.

The NADPH-dependent Bdh was more efficient than the native enzyme, especially for acetoin concentrations higher than 200 mM, for which 76-100 % of the acetoin

was consumed, corresponding to a maximum of 311 mM NADPH oxidized (Figure 2A). The amount of NADPH consumed by the modified NADPH-Bdh enzyme (39.2 to 207.3 mmol.gDW⁻¹) was compared to the NADPH demand for anabolism (Figure 2B) determined from biomass composition (5.35 mmol/gDW; supplementary file 2 Table S2.3): this suggests that the NADPH perturbation imposed by the Bdh system corresponds to between 8 and 40-fold the NADPH demand required for anabolism. It is therefore a substantial perturbation (Figure 2B).

To evaluate the NADH perturbation, we compared the amount of NADH consumed by the overexpressed native NADH-Bdh1p enzyme (between 1.9 and 98.7 mmol/gDW) to the amount of NADH reoxidized via the glycerol pathway (8.6 to 25 mmol/gDW). This pathway is the major NADH reoxidation pathway after ethanol production during fermentation (Figure 2C). This comparison indicates that the NADH perturbation corresponded to 3.9 to 5.2 times the NADH consumption by the glycerol pathway.

3.3. Effects of NAD(P)H perturbation on growth and extracellular metabolites

The growth and metabolic characteristics of control and perturbed strains were investigated in the presence of 0 to 400 mM acetoin.

Previous studies report that 45 and 90 mM acetoin had no effect on growth (Roustan and Sablayrolles, 2002). The growth rate and biomass formation of the control strain were not affected by the presence of up to 200 mM acetoin (corresponding to 50 mM consumed) but were partially inhibited at higher concentrations (Table 2). This is consistent with the high tolerance of *S. cerevisiae* for acetoin. NADH-Bdh and NADPH-Bdh strains were even more tolerant, only acetoin concentrations above 100 mM

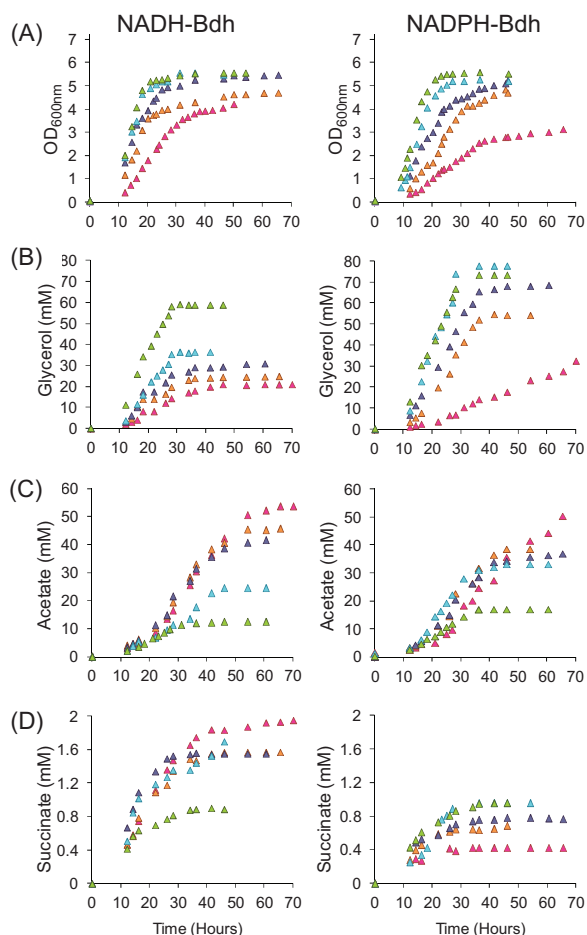


Figure 3 - Effects of perturbation of NADH and NADPH levels on growth and production of selected metabolites.

Growth (A), glycerol (B), acetate (C) and succinate (D) production during batch fermentation on 2xSD 10 % glucose of strains NADH-Bdh (left column) and NADPH-Bdh (right column) in the presence of 0 (green), 100 mM (turquoise), 200 mM (purple), 300 mM (orange) and 400 mM (magenta) acetoin.

affected growth (Table 2), and affected the two strains similarly (Table 2).

Redox cofactors are highly connected metabolites and perturbing the redox balance is expected to have large repercussions on metabolic fluxes to maintain homeostasis. Indeed, in the presence of acetoin, patterns of by-product formation were very different to that of the control condition, in particular for glycerol, acetate and succinate (Figure 3).

The response to NADH perturbation was a gradual decrease in glycerol formation, consistent with the role of glycerol in maintaining NADH homeostasis (Figure

Strain	Metabolite concentration (mmol/gDW)									Carbon recovery (%)	Redox Balance (%)	Growth rate (h ⁻¹)	Biomass (g.L ⁻¹)
	Acetoin addition	Acetoin consumed	Ethanol	Glycerol	Acetate	Succinate	Pyruvate	AKG	Acal				
59A	0	0.0	332.5	19.7	3.0	0.3	0.1	0.0	0.0	97.8	100.0	0.40	2.95
	100	13.6	334.2	16.3	5.7	0.4	0.1	0.0	0.3	97.8	98.9	0.40	2.95
	200	17.8	342.7	15.6	6.7	0.4	0.1	0.0	0.3	97.8	98.4	0.40	2.81
	300	25.1	371.5	15.2	9.4	0.4	0.1	0.0	0.3	97.2	96.3	0.30	2.59
	400	28.5	377.1	13.4	12.7	0.7	0.2	0.1	0.4	97.1	97.7	0.29	2.60
NADH-Bdh	0	0.0	339.4	20.4	3.0	0.3	0.1	0.0	0.0	98.1	99.2	0.40	2.90
	100	35.7	340.1	13.0	8.8	0.6	0.1	0.0	0.4	96.8	95.0	0.40	2.80
	200	63.2	363.0	10.3	16.4	0.6	0.1	0.1	1.1	94.6	94.3	0.30	2.53
	300	75.6	416.3	11.5	21.1	0.7	0.1	0.1	1.6	90.4	91.3	0.30	2.17
	400	98.4	497.8	10.2	28.7	1.0	0.2	0.1	1.6	94.8	90.0	0.20	1.87
NADPH-Bdh	0	0.0	335.9	25.3	5.9	0.3	0.1	0.0	0.0	99.7	97.9	0.40	2.90
	100	39.2	366.8	29.4	12.9	0.4	0.1	0.0	0.0	99.6	96.1	0.36	2.55
	200	56.6	346.8	25.9	13.9	0.3	0.2	0.1	0.0	99.9	95.0	0.23	2.65
	300	112.9	423.3	25.3	17.7	0.3	0.3	0.1	0.0	97.7	93.0	0.15	2.17
	400	207.3	612.0	21.5	33.6	0.3	0.5	0.1	0.2	96.9	89.0	0.07	1.50

Table 2. Effects of redox perturbation in 59A and derived strains on extracellular metabolite production at the end of fermentation, growth and biomass formation. Experiments were carried out with 2X SD media containing 100 g/liter glucose. AKG, α -ketoglutarate, Acal, acetaldehyde.

3B). The acetaldehyde node was also affected: increased excretion of acetate and acetaldehyde (Table 2). This effect was dependent on the acetoin concentration and probably reflects a limitation of the NADH-dependent alcohol dehydrogenase reaction. Similar effects have been described in the context of NADH shortage, for example in glycerol overproducing strains (Remize et al., 1999). Succinate is also a marker of NADH metabolism: this organic acid can be formed by the reductive branch of TCA pathway involving the oxidation of NADH or by the oxidative branch, generating NADH. In the NADH-Bdh strain, the succinate production increased with NADH perturbation (Figure 3D), suggesting that it was mainly synthesized by the oxidative branch of TCA under these conditions, providing extra NADH.

As expected, the behavior of the NADPH-Bdh strain was very different. Glycerol synthesis was almost unaffected by 100, 200 and 300 mM acetoin (Figure 3B, Table 2). Surprisingly, however, at 400 mM, glycerol formation was reduced. This suggests that at high acetoin concentrations, there may be exchange between the redox cofactors NAD(H) and NADP(H). In the last steps of acetate synthesis,

pyruvate is converted into acetaldehyde by pyruvate decarboxylase and then into acetate by the NADP⁺-dependent cytoplasmic aldehyde dehydrogenase Ald6p, such that 1 mol of NADPH is synthesized per mol of acetate. As expected, acetate production in the modified NADPH-Bdh strain increased proportionally with the acetoin concentration (Figure 3C). The greater acetate formation may therefore allow compensation, at least in part, for the consumption of NADPH. Thus, the mechanisms underlying the increased production of acetate are very different depending on the cofactor involved. Contrary to what was observed for the NADH-Bdh strain, redox perturbation had no effect on the production of acetaldehyde, except very slightly at the highest acetoin concentration (Table 2).

Succinate production was not much affected by NADPH oxidation but tended to decrease with increasing acetoin concentration. The reason for this is unclear, but may reflect changes in flux distribution at the pyruvate node to redirect carbon to acetate production.

In summary, changing the balance of cofactors results in marked metabolic changes that are specific for each cofactor. Interestingly, in the case of the NADPH, we report a gradual response to weak

perturbation (100-200 mM acetoin) and a metabolic shift following severe perturbation (400 mM acetoin). We therefore analyzed this response more comprehensively.

3.4. Development of a reduced model of yeast fermentation (*DynamoYeast*)

We developed a curated constraint-based model of yeast metabolism during alcoholic fermentation from the literature and our findings. Our objective was to accurately predict the mass distribution within the metabolic network to explain how redox is managed. We focused on central carbon metabolism (CCM), taking into account the pathways responsible for most carbon utilisation *i.e.* carbohydrates, proteins and lipids. We started from a recent version of the yeast genome-scale model, iIN800 (Nookaew et al., 2008) and we extracted the central carbon metabolism (CCM), including glycolysis, the PP pathway, the TCA cycle and formation of the precursors of macromolecules for biomass synthesis. Then, we manually identified the enzymes active in fermentation and aggregated the reactions of biomass biosynthesis from metabolic precursors involved in CCM (supplementary file 1). We described exhaustively the metabolic pathways that contribute to maintaining the redox balance by including (i) the isoenzymes that can use NAD(H) or NADP(H) as cofactors (ii) putative redox cycles and (iii) NAD(H) kinases. Special attention was given to compartmentalization, by including 16 mitochondrial carriers and the energy costs of these transports. The resulting *DynamoYeast* model describing the central carbon metabolism contains 87 reactions linking 77 metabolites encoded by 72 ORFs (supplementary file 1). *DynamoYeast* has then been fully validated by using data from the literature (predictions of lethal mutations and recovery of previously published mass distribution) and by using our own data set (supplementary file 1).

3.5. Model-based data reconciliation

We developed a dedicated constraint-based modeling method, named dynamic Mass Balanced Analysis (dMBA) (Material and Methods) allowing the comparison of the data set with the model for all time points of batch fermentation in one step and based on mass distribution. The method predicts the mass distribution for all time points (i) by minimizing the sum of the absolute errors between predicted and measured amounts of glucose and ethanol; (ii) by setting the uptake of acetoin and the excretion of other byproducts (glycerol, acetate, pyruvate, α -ketoglutarate and succinate) to their measured values. We explored the effects of various assumptions on the configurations of CCM (through the selection of “active” chemical reactions in *DynamoYeast*), as reported in Table 3. These configurations were compared to experimental data for the reference condition without acetoin (data reconciliation) by solving the dMBA optimization problem. We first solved the optimization problem with the on/off scenario for chemical reactions described in Model 0 (Table 3). Under these assumptions, the experimental data and Model 0 could not be reconciled, *i.e.* the associated optimization problem was not feasible. The same scenario with a free glycerol flux also failed to reconcile the experimental data and Model 0.

By calculating the total amount of NADH produced from biomass and extracellular metabolites, a theoretical glycerol production of 7.2 mmol/gDW (Materials and Methods) was estimated for strain NADPH-Bdh. However, the production of glycerol measured experimentally was 18.7 mmol/gDW, more than twice the calculated value (Figure 5B). A similar excess of cytosolic NADH has been reported for the wine yeast V5 during fermentation on a synthetic medium containing 20 % glucose

	Ald2p	oxaloacetate_ malate shuttle	acetaldehyde_ ethanol shuttle	glutamate shuttle (Gdh1p/Gdh2p)	glutamate shuttle (Gdh3p/Gdh2p)	Ald6p
Model0	off	off	off	off	off	on
Model1	on	off	on	off	off	off
Model2	off	off	on	off	off	on
Model3	off	off	on	on	off	on
Model4	off	off	on	off	on	on
Model5	off	on	on	off	off	on

Table 3. Potential reactions or redox cycles that result in a net production of cytosolic NADH. The reactions activated in the *DynamoYeast* model are indicated by "on". Ald2p, NAD⁺-dependent acetaldehyde dehydrogenase; Ald6p, NADP⁺-dependent acetaldehyde dehydrogenase.

	Biomass	Ethanol	Glycerol	PPP	Ald6p	Ald2p	acetaldehyde _ethanol shuttle	glutamate shuttle	oxaloacetate _malate shuttle
Experimental wt	1	201.9	18.7						
Model0	lethal								
Model1	lethal								
Model2	lethal								
Model3	1	201.8	18.7	6.0	2.2	off	10.8	9.5	off
Model4	lethal								
Model5	1	201.8	18.7	6.0	2.2	off	off	9.8	10.0

Table 4. *DynamoYeast* model predictions

Different scenarios including reactions involved in a net production of cytosolic NADH were tested to reconcile the theoretical metabolic network and the experimental data. Ald, acetaldehyde dehydrogenase; PPP, pentoses phosphate pathway; Gdh, glutamate dehydrogenase.

(Sainz et al., 2003).

The inability of the model to predict glycerol production indicates that some

metabolic reactions leading to a net synthesis of cytosolic NADH are not taken into account in the on/off scenario or are missing from the metabolic network. Consequently, we exhaustively explored various possible sources of cytosolic NADH production.

We first considered whether the NAD⁺-dependent acetaldehyde dehydrogenases encoded by *ALD2* and *ALD3* contribute acetate production, generating cytosolic NADH. The reaction catalyzed by Ald2p was turned on while that catalyzed by Ald6p, the NADP⁺-dependent acetaldehyde dehydrogenase, was turned off (Table 3: Model 1); this failed to reconcile the experimental data and Model 1. In this scenario, one mole of NADH is produced per mole of acetate produced, so 13.6 mmol/gDW of acetate would be required to produce the NADH surplus,

whereas the experimental data indicate only 2.2 mmol/gDW of acetate. Therefore, the on/off scenario corresponding to Model 1 is not consistent with the experimental data.

We also considered other pathways, including the synthesis of higher alcohols and esters derived from the catabolism of amino acids, not included in our reduced metabolic network. To estimate the amount of NADH formed by these pathways, we assayed the volatile aroma compounds produced by the strain NADPH-Bdh: at the end of fermentation, the total amount of aroma compounds produced was 342 μ M/gDW (data not shown). Therefore, the contribution of this pathway to NADH production was very low. Moreover, since the carbon balances closed within 2-3 % (Table 2), it seems unlikely that a NADH surplus of the magnitude observed (11.5 mmol/gDW) is due to a reaction that excretes a metabolite.

NADH may also be produced by non-growth associated processes such as lipid

turnover (Rajukamari et al., 2008). The cytosolic NADH production flux of protein and lipid biosynthesis pathways can be deduced from the biomass composition and the growth rate of NADPH-Bdh, (supplementary file 2, Table S2.3; Table 1). At a growth rate at 0.4 h^{-1} , the NADH production flux for lipids is $8 \cdot 10^{-4} \text{ mmol/gDW/h}$. We roughly estimated the contribution of lipid turnover to NADH production by assuming that 50 % of the cellular lipid content is regenerated each hour and that the flux of NADH produced is $9 \cdot 10^{-4} \text{ mmol/gDW/h}$. In this scenario, the amount of lipid required to produce the NADH surplus would be 1800 times greater than that measured.

NADH is therefore presumably generated by a cycle resulting in a net production of cytosolic NADH. Several shuttles involving coupled reactions and resulting in the exchange of redox cofactors between cytosol and mitochondria have been described in yeast. They include the acetaldehyde/ethanol shuttle and the oxaloacetate/malate shuttle that could lead to cytosolic NADH production (Von Jagow and Klingerberg, 1970; Bakker et al., 2000; Bakker et al., 2001; Valadi et al., 2004) and the glutamate shuttle that could produce mitochondrial NADH.

The acetaldehyde/ethanol shuttle involves the free diffusion of acetaldehyde and ethanol through the mitochondrial membrane and the reduction of acetaldehyde to ethanol in the mitochondria by Adh3p. This results in reoxidization of mitochondrial NADH and, as a consequence, in a higher availability of NADH in the cytosol. There is experimental evidence that this shuttle plays a role in anaerobiosis to reoxidize the mitochondrial NADH (Nissen et al., 1997; Bakker et al., 2000). Consequently, we systematically activated this shuttle in our network (Table 3). However, the activation of this shuttle alone (Table 3: Model 2) failed to reconcile the experimental data.

The glutamate shuttle, which combines the cytosolic NADPH-dependent glutamate dehydrogenase Gdh1p and the mitochondrial NAD^+ -dependent Gdh2p, results in cytosolic NADPH consumption. When the acetaldehyde/ethanol shuttle and the glutamate shuttle are both turned on (Table 3: Model 3), the experimental data and the model were reconciled (Table 4: Model 3). This combination operated as a transhydrogenase, resulting in the exchange of NAD^+ and NADPH to NADH and NADP^+ . We also tested the possibility of a cycle involving Gdh2p and the NADP^+ mitochondrial glutamate dehydrogenase Gdh3p, but this scenario (Table 3: Model 4) also failed to reconcile the data.

The oxaloacetate/malate shuttle involves the cytosolic and mitochondrial malate dehydrogenases Mdh2p and Mdh1p and the mitochondrial carriers Dic1p and Oac1p for malate and oxaloacetate, respectively. When the oxaloacetate/malate shuttle was coupled to the glutamate cycle in our model, the experimental data were recovered (Table 3: Model 5). However, the oxaloacetate/malate shuttle involves Mdh2p producing cytosolic NADH and oxaloacetate from malate and NAD^+ , which is not a thermodynamically favourable reaction during fermentation.

In summary, the reconciliation of the experimental and predicted data suggests the coupling of the glutamate shuttle (Gdh1p/Gdh2p) to the ethanol-acetaldehyde shuttle (hereafter named ACAL/GLU). The net production of cytosolic NADH by the combination of these shuttles is balanced by the production of glycerol. This transhydrogenase-like reaction then corresponds to an additional source of NADPH consumption producing cytosolic NADH. To test the validity of this model (Model 3), we solved the dMBA optimization problem for the strain NADPH-Bdh in the control condition (without NADPH perturbation) and in the presence of each 100, 200 and 300 mM

acetoin. A good agreement was observed between experimental and predicted ethanol production, glucose consumption and biomass formation: the mean relative error between measured and predicted values for glucose (and ethanol) was 3.2%, 8%, 6.1% and 3.7% (and 1.3%, 1%, 0% and 0%) at acetoin concentrations of 0, 100, 200 and 300 mM (supplementary file 4). These discrepancies are consistent with intrinsic measurement errors (around 5%).

The reconciliation between Model 3 and experimental data also reveals a very high ATP consumption required for maintenance (supplementary file 6). During fermentation, ethanol accumulation in the medium is associated with passive influx of protons across the membrane; protons are extruded by the membrane ATPase to maintain pH homeostasis (Orii et al., 2011; Martinez-Muñoz and Kane, 2008). To test whether the observed high ATP consumption was linked to the high ethanol production in our conditions, we estimated the ATP consumption flux from ethanol in the presence of 0, 100 and 200 mM acetoin (Materials and Methods). We observed the same linear dependence between the estimation of the flux of ATP consumption for maintenance and ethanol in all three conditions. The flux of ATP consumption varied from 0 mmol/gDW/h to 11.5 mmol/gDW/h for conditions 0 and 100 mmol of acetoin, and from 1.5 to 15 mmol/gDW/h for 200 mmol of acetoin (supplementary file 6). These estimations are consistent with previous work (Leão et al., 1984) reporting a passive influx of protons of between from 1.07 and 2.77 mmol/gDW/h as ethanol accumulated from 0 and 8 % (v/v). Therefore, passive proton influx may explain the high predicted ATP production for maintenance. For 300 mM acetoin, the dependence between ATP consumption for maintenance and ethanol was again linear, but the estimated flux of ATP consumption for maintenance was higher than the other conditions, especially for lower amounts of ethanol, suggesting an additional source of ATP consumption.

3.6. Model-based analysis of the response to NADPH perturbation

To obtain an overview of the effects of NADPH perturbation on CCM, we used the predictions from the data reconciliation with *DynamoYeast* described above to calculate the amount of NADH and NADPH consumed and produced in various pathways at a time point corresponding to 90 % of total biomass formed (Figure 4).

Under the reference conditions, the yeast strain relied heavily on the PP pathway for NADPH formation, although the NADP⁺-dependent acetaldehyde dehydrogenase was found also to contribute significantly, consistent with previous studies (Blank et al., 2005; Frick and Wittmann et al., 2005). These two pathways contributed to 80 % and 20 % of the NADPH needed for biomass production, respectively (supplementary file 2 Table S2.3, Figure 4A). The amount of NADPH produced by Ald6p and the PP pathway increased gradually with the acetoin concentration (Figure 4A).

For the reference condition and the three perturbed conditions (100, 200, 300 mM acetoin), the amount of NADH consumed during the synthesis of glycerol was significantly higher than that produced during the production of biomass, acetate, succinate, α -ketoglutarate and pyruvate. As the carbon balance is closed, these results imply the existence of a metabolic shuttle resulting in net cytosolic NADH production.

3.7. The DHA cycle, a "transhydrogenase-like" cycle involved in the response to high NADPH demand

In the 400 mM acetoin condition, Model 4 failed to reconcile the experimental data and the metabolic network. This perturbation resulted in a dramatic decrease of the glycerol production. In addition, the production of glycerol did not even balance the cytosolic NADH produced by the biomass and byproducts

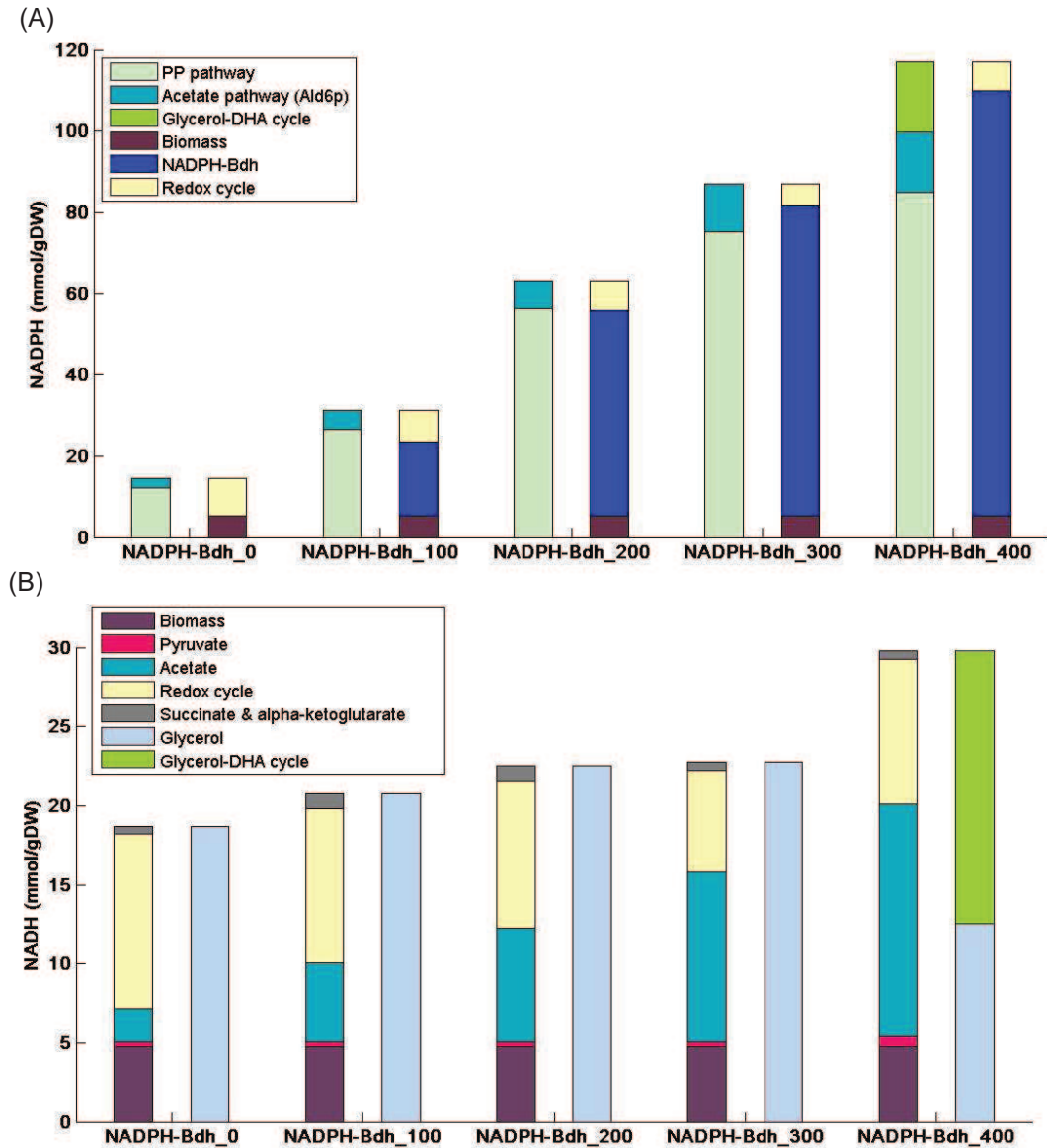


Figure 4: Redox balance for each NADPH perturbation condition.

NADPH (A) and NADH (B) balances as predicted by the *DynamoYeast* model in response to five levels of NADPH perturbation (0, 100, 200, 300 and 400 mM acetoin) and at 90 % of biomass formed which correspond to, respectively, 21, 22, 28, 37, 54 hours of fermentation. Left bar: quantity (mmol per gram of biomass) of pyridine nucleotides produced; Right bar: amount of pyridine nucleotides consumed.

formation.

Therefore, reduced equivalents could be transferred from NADH to NADP^+ to produce NADPH. We then looked for another shuttle involving the conversion of NADH in NADP^+ .

The glycerol-DHA shuttle couples the NADH-dependent glycerol-3-dehydrogenases Gpd1p and Gpd2 catalysing the conversion of dihydroxyacetone (DHA) to glycerol and

the NADP^+ -dependent glycerol dehydrogenases (GLDH) producing DHA from glycerol, encoded by at least four genes (*ARA1*, *GXY1*, *GRE3* and *YPR1*) (Figure 5) (Oechsner et al., 1988; Kuhn et al., 1995; Nakurama et al., 1997; Kim et al., 1998). DHA is converted into DHAP by dihydroxyacetone kinases (DAKs) which consume ATP and are encoded by *DAK1* and *DAK2* (Figure 5).

To investigate the potential role of this

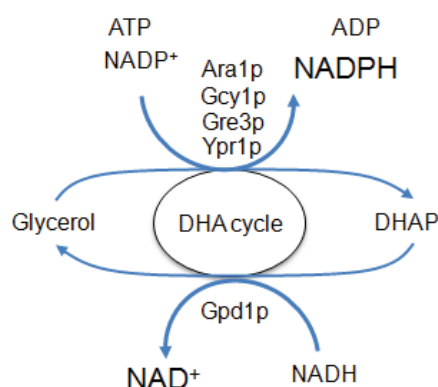


Figure 5: Proposed transhydrogenase-like cycle to maintain the NADPH balance in the presence of 400mM acetoin

Schematic representation of the glycerol-dihydroxyacetone (DHA) cycle, reoxidizing cytosolic NADH *via* the glycerol 3-phosphate-dehydrogenase and generating cytosolic NADPH *via* the glycerol dehydrogenase at the expense of one ATP. Gpd1p, glycerol 3-phosphate-dehydrogenase; Ara1p, Gcy1p, Gre3p, Ypr1p, glycerol dehydrogenase; DHAP, dihydroxyacetone phosphate.

cycle in response to a very high level of

NADPH oxidation (400 mM acetoin), the reactions of this cycle were turned on.

In parallel, we estimated ATP maintenance for 400 mM acetoin from experimental data for ethanol and from the ATP consumption coefficient deduced for the reference condition (supplementary file 6). Then we performed the data reconciliation (Materials and Methods) turning on the DHA cycle and constraining the ATP for maintenance to its estimated value. The results indicate that this cycle acts as a transhydrogenase cycle to transfer reducing equivalents from NADH to NADP^+ . The cycle ACAL/GLU is still operational in this condition. Interestingly, the prediction of the contribution of this cycle to the NADPH balance in this condition is of the same magnitude with respect to the other perturbations (Figure 4A). In this condition (400 mM acetoin), the PP pathway was responsible for 68% of the total NADPH production, which is much lower than at 200-300 mM acetoin (86-87%) (Figure 4A). This suggests a

saturation of the capacity of the PP pathway, whereas the contribution of the acetate pathway remained fairly constant between 200 and 400 mM acetoin. These two pathways covered 90% of the NADPH demand. In addition to the NADPH production, the DHA cycle allows the reoxidation of the NADH. Consequently, the contribution of the ACAL/GLU shuttle decreased with the concentration of acetoin.

4. Discussion

In this study, we developed a 87-equation stoichiometric model of *S. cerevisiae* fermentative metabolism to analyze the response to perturbation of NADPH levels. We used an original genetic set-up, based on the expression of a NADPH-dependent 2,3-butanediol dehydrogenase (Ehsani et al., 2009a), to manipulate the intracellular NADPH/ NADP^+ ratio. The model was used to analyze the effects of the increased NADPH oxidation, using experimental data (final concentrations of metabolic products and biomass composition) as a full set of anaerobic constraints to predict quantitatively the intracellular flux distribution. The reconciliation of experimental data and model predictions provides insights into the strategies used by *S. cerevisiae* to maintain homeostasis; in particular, this highlighted the importance of compartmentalization and redox shuttling in maintaining the redox balance.

4.1. Glycerol synthesis and redox balancing in the strain 59A

The first and striking observation was the substantial surplus of cytosolic NADH produced by 59A and derived strains studied. Glycerol synthesis has important functions in yeast related to redox balancing (Oura, 1977; Valadi et al., 2004; Nordström, 1968; Van Dijken and

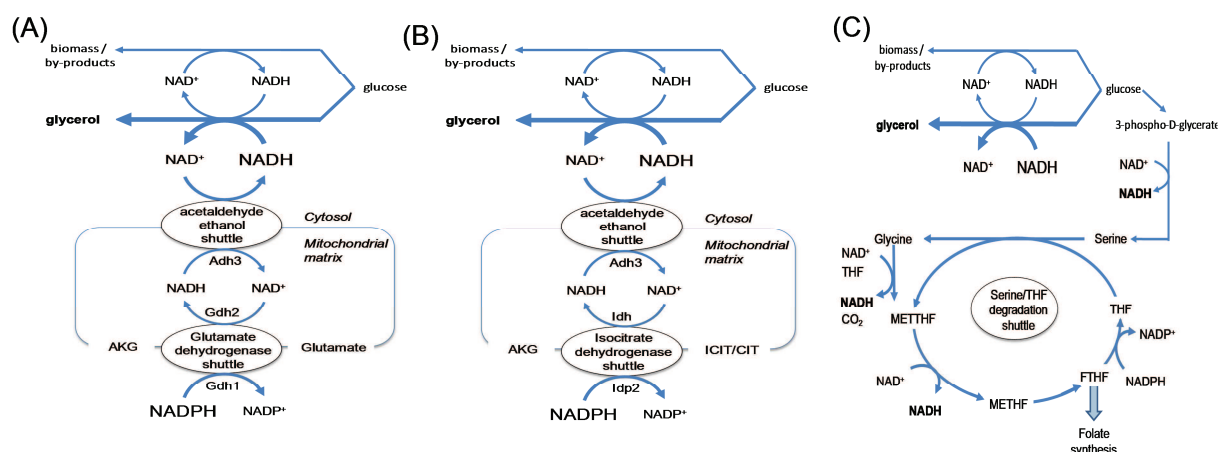


Figure 6: Proposed metabolic cycles resulting in a net production of cytosolic NADH

The acetaldehyde-glutamate cycle (ACAL/GLU) (A) and the acetaldehyde-isocitrate (ACAL/ICIT) (B) are a potential redox cycle resulting in the net formation of cytosolic NADH. These cycles involve the glutamate and isocitrate shuttles which exchange cytosolic NADPH for mitochondrial NADH, and the ethanol-acetaldehyde shuttle which exchanges mitochondrial NADH for cytosolic NADH. Under anaerobic conditions this NADH may be reoxidized via formation of glycerol.

The serine degradation shuttle (C) is a hypothetical cycle including the degradation of serine to glycine by the serine hydroxymethyltransferase (SHMT) which is coupled with the conversion of THF in METTHF. The glycine is oxidized into METTHF by the glycine cleavage complex and METTHF is included in a cycle involved in folate biosynthesis, generating the THF. Two NADH are generated by the glycine cleavage and the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and one NADPH is formed by the dihydrofolate reductase (DHFR). Gdhp, glutamate dehydrogenase; Adhp, alcohol dehydrogenase; Idhp and Idpp, isocitrate dehydrogenase; THF, tetrahydrofolate; METTHF, 5,10-methylene-THF; METHF, 5,10-methenyl-THF; FTHF, 10-formyl-THF.

Scheffers, 1986; Albers et al., 1996) and to the hyperosmotic stress response (Blomberg and Adler, 1992). In addition to sugar content and osmotic stress, many environmental factors influence the production of glycerol, such as pH, temperature, and phosphate, nitrogen and oxygen availability; glycerol production also differs between yeast strains (Scanes et al., 1998). In the conditions used in this study, the moderate osmotic stress (100 g/L sugar) may have favored glycerol production, explaining the surplus glycerol produced relative to the NADH demand for biomass and by-products. However, we cannot exclude a strain effect, as the strain 59A gives a higher glycerol yield than its parental strain EC1118 and various other *S. cerevisiae* isolates (Camarasa et al., 2011). Indeed, depending on the strain and conditions, glycerol synthesis may partially or totally balance the NADH demand or may be produced in excess (Albers et al., 1996; Verduyn et al., 1991; Frick and Wittmann, 2005; Lagunas, 1973; Sainz et

al., 2003).

Reconciliation of the data obtained for 59A predicted the existence of a redox shuttle that results in a net production of cytosolic NADH. The coupling of the anabolic NADPH-dependent glutamate dehydrogenase, responsible for ammonium assimilation, and of the catabolic NADH-dependent glutamate dehydrogenase, working in the reverse direction, results in a metabolic cycle in which NADPH is converted to NADH. It has been suggested that this cycle may provide the NADH required for the activity of malate dehydrogenase in a strain in which the malic enzyme is relocalized into the cytosol (Moreira dos Santos et al., 2004). Overexpression of the NADH-dependent glutamate dehydrogenase has provided experimental evidence of a functional cycle (Boles et al., 1993), but it is not known if the expression of *GDH2*, which is regulated by nitrogen and catabolic repression, can support the operation of this cycle during fermentation. To test this,

we deleted *GDH2* from strains 59A and NADPH-Bdh and the null mutants were grown in conditions similar to those used in this study. The deletion of *GDH2* did not decrease glycerol production, suggesting that the NADH-dependent GDH is not operative during anaerobic fermentation on glucose (data not shown). It is also possible that there is an enzyme that produces NADH in the mitochondria. Potential redox shunts in yeast have been described, for example involving the coupling between the mitochondrial NAD^+ - and cytosolic NADP^+ -dependent isocitrate dehydrogenases (Idh complex/Idp2p) or between the acetaldehyde dehydrogenase (Ald4p/Ald6p) isoforms (Sazanov and Jackson, 1994; Meaden et al., 1997). Acetaldehyde dehydrogenase is unlikely to be involved in such shuttles, as a pyruvate decarboxylase mutant cannot grow on glucose unless acetate is provided, indicating that acetate produced in the mitochondria cannot be exported to the cytosol (Moreira dos Santos et al., 2004). However, a net conversion of NADPH and NAD^+ into NADH and NADP^+ would result if the mitochondrial Idhp complex generated α -ketoglutarate while Idp2p functioned in the opposite direction. This redox shuttle would involve the isocitrate-citrate antiporter and the α -ketoglutarate transporter. We tested this scenario in the model, and its prediction of the experimental results was satisfactory (data not shown). This possibility is therefore an alternative to the glutamate shuttle, although the direction of Idp2p reaction in this cycle is not thermodynamically favorable. Other more complex cycles involving amino acid degradation pathways may also be potentially involved. For example, the enzymes catabolizing serine are localized both in the cytoplasm and in the mitochondria and may provide a mechanism to generate NADH in the cytosol (Figure 6).

4.2. Strategies to increase NADPH

production in response to NADPH perturbation

In response to increased NADPH oxidation, the contribution of the major NADPH production pathways (the PP and acetate pathways) gradually increased as the acetoin concentration increased from 100 to 400 mM. However, for the highest NADPH perturbation, corresponding to 40-fold the anabolic demand, the contribution of the PP pathway to the total NADPH production increased only slightly suggesting saturation of the capacity of this pathway (Figure 4). The flux through the PP pathway is mainly controlled by metabolic regulation. In particular, the flux through the glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and the 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) which both catalyze NADP^+ -dependent reactions, depends on the NADPH/ NADP^+ ratio (Llobell et al. 1988; Vaseghi et al., 1999).

Therefore, the gradual increase of the PP pathway contribution may be due to the relief of inhibition exerted on these enzymes, as the availability of NADPH decreases. This is consistent with a saturation of the pathway when the concentration of NADPH is very low (and that of NADP^+ is very high). Indeed, we observed a shift in the rate of acetoin consumption after the cells reached the stationary phase, which is consistent with a greater availability of NADPH (data not shown).

The saturation of the PP pathway in response to markedly reduced NADPH availability was correlated with a clear decrease in glycerol production. Since glycerol is a marker of NADH metabolism, this result is remarkable, as it suggests an exchange of the NAD(H) and NADP(H) cofactors. Model-based data reconciliation suggested the activation of the glycerol-DHA shuttle. The role of the "DHA cycle" has not been clearly defined. The expression of DAK genes is regulated under variety of stress conditions,

including heat, osmotic, oxidative, ethanol and cadmium stresses (Boy-Marcotte et al., 1999; Gasch et al., 2000; Godon et al., 1998; Ma and Liu., 2010; Vido et al., 2001, Hohmann 2002). It has been suggested that this cycle could play various roles such as detoxication of DHA (Molin et al., 2003), fine tuning of glycerol accumulation and excretion, exchange of NADH and NADPH cofactors (Norbeck and Blomberg, 1997; Costenoble et al., 2000) and an energy valve (ATP futile cycle activated under stress conditions). In agreement with Costenoble et al (2000), our model and data also suggest that the glycerol-DHA system could be involved in the redox regulation of yeast, as an alternative route for providing NADPH from NADH when the capacity of the PP pathway is saturated. When the NADPH demand is high, the level of intracellular NADP^+ is expected to be very high, such that the first step of DHA cycle, the NADP^+ -dependent glycerol dehydrogenase, should be thermodynamically stimulated. The glycerol-DHA shuttle may be transiently induced to cope with a transitory very strong demand of NADPH, for example during extreme oxidative stress.

The decrease in the maximum specific growth rate and biomass yield at high acetoin concentrations and thus severe NADPH perturbation was most probably a consequence of ATP consumption in this metabolic shunt (Table 2). Moreover, although *DynamoYeast* was able to predict a solution for the 300 mM acetoin condition, the ATP demand was very much higher (from the beginning of fermentation) and in the 100 and 200 mM acetoin conditions (supplementary file 6). This suggests that the glycerol-DHA cycle may be required to some extent in this condition. This is supported by the slight decrease observed in glycerol formation when the demand for NADPH is 22-fold higher than the anabolic demand, suggesting a limited capacity of the PP pathway under these conditions.

5. Conclusion

A systems biology approach combining the constraint-based modeling and the measurement of extracellular metabolites has revealed two types of metabolic response according to the degree of NADPH perturbation. To respond to a progressively enhanced NADPH demand, the cell increases the fluxes through the two main NADPH-producing pathways with a same relative contribution. If the demand for NADPH raises to more than 20-fold the anabolic demand, a saturation of the PP pathway was observed, and additional NADPH was produced through a cycle involving an exchange between the redox cofactors NADH and NADPH. This study might provide valuable new insights for the design of strategies based on redox engineering (van der Donk and Zhao, 2003; Nevoigt, 2008).

Acknowledgements

We thank Brigitte Cambon and Virginie Galeote for their assistance with strain construction and Cécile Cadoux for her help with lipid analysis. This study was supported by the AgroBI 2006–2008 INRA program.

References

- Albers, C. S., Kattner, G. and Hagen, W., 1996. The compositions of wax esters, triacylglycerols and phospholipids in Arctic and Antarctic copepods: evidence of energetic adaptations. *Mar. Chem.* 55, 347-358.
- Ambroset C., Petit M., Brion C., Sanchez I., Delobel P., Guérin C., Chiapello H., Nicolas P., Bigey F., Dequin S., Blondin B., 2011. Deciphering the molecular basis of wine yeast fermentation traits using a combined genetic and genomic approach. *G3* doi: 10.1534/g3.111.000422.
- Anderlund, M., Nissen, T. L., Nielsen, J.,

- Villadsen, J., Rydstrom, J., Hahn-Hagerdal, B. and Kielland-Brandt, M. C., 1999. Expression of the *Escherichia coli* pntA and pntB genes, encoding nicotinamide nucleotide transhydrogenase, in *Saccharomyces cerevisiae* and its effect on product formation during anaerobic glucose fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2333-2340.
- Bakker, B. M., Bro, C., Kotter, P., Luttik, M. A. H., Van Dijken, J. P. and Pronk, J. T., 2000. The mitochondrial alcohol dehydrogenase Adh3p is involved in a redox shuttle in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 182, 4730-4737.
- Bakker, B. M., Overkamp, K. M., van Maris, A. J., Kotter, P., Luttik, M. A., van Dijken, J. P. and Pronk, J. T., 2001. Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 15-37.
- Blank, L. M., Kuepfer, L. and Sauer, U., 2005. Large-scale ¹³C-flux analysis reveals mechanistic principles of metabolic network robustness to null mutations in yeast. *Genome Biol.* 6, R49.
- Bligh, E. G. and Dyer, W. J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917.
- Blomberg, A. and Adler, L., 1992. Physiology of osmotolerance in fungi. *Adv. Microb. Physiol* 33, 145-212.
- Boles, E., Lehnert, W. and Zimmermann, F. K., 1993. The role of the NAD dependent glutamate dehydrogenase in restoring growth on glucose of a *Saccharomyces cerevisiae* phosphoglucose isomerase mutant. *Eur. J. Biochem.* 217, 469-477.
- Boy-Marcotte, E., Lagniel, G., Perrot, M., Bussereau, F., Boudsocq, A., Jacquet, M. and Labarre, J., 1999. The heat shock response in yeast: differential regulations and contributions of the Msn2p/Msn4p and Hsf1p regulons. *Mol. Microbiol.* 33, 274-283.
- Boyd, S. P. and Vandenberghe, L., 2004. Convex optimization. Cambridge Univ Press.
- Bruinenberg, P. M., Van Dijken, J. P. and Scheffers, W. A., 1983. A theoretical analysis of NADPH production and consumption in yeasts. *J. Gen. Microbiol.* 129, 953-964.
- Bruinenberg PM., 1986. The NADP(H) redox couple in yeast metabolism. *Antonie Van Leeuwenhoek* 5, 411-29.
- Camarasa, C., Sanchez I., Brial P., Bigey F., Dequin S., 2011. Phenotypic landscape of *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation: evidence for origin-dependent metabolic traits. *Plos ONE* 6: e25147. doi:10.1371/journal.pone.0025147
- Cortassa S, Aon JC, Aon MA., 1995. Fluxes of carbon, phosphorylation, and redox intermediates during growth of *Saccharomyces cerevisiae* on different carbon sources. *Biotechnol. Bioeng.* 47, 193-208.
- Costenoble R, Valadi H, Gustafsson L, Niklasson C, Franzén CJ., 2000. Microaerobic glycerol formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 16, 483-95.
- Ehsani, M., Fernández, M. R., Biosca, J. A. and Dequin, S., 2009a. Reversal of coenzyme specificity of 2, 3-butanediol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae* and in vivo functional analysis. *Biotechnol. Bioeng.* 104, 381-389.
- Ehsani, M., Fernandez, M. R., Biosca, J. A., Julien, A. and Dequin, S., 2009b. Engineering of 2, 3-butanediol dehydrogenase to reduce acetoin formation by glycerol-overproducing, low-alcohol *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 3196-3205.
- Forster, J., Famili, I., Fu, P. C., Palsson, B. O. and Nielsen, J., 2003. Genome-Scale reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* metabolic network. *Genome Res.* 13, 244-253.
- Frick, O. and Wittmann, C., 2005.

- Characterization of the metabolic shift between oxidative and fermentative growth in *Saccharomyces cerevisiae* by comparative ^{13}C flux analysis. *Microb. Cell Fact.* 4, 30.
- Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., Botstein, D. and Brown, P. O., 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell.* 11, 4241-4257.
- Godon, C., Lagniel, G., Lee, J., Buhler, J. M., Kieffer, S., Perrot, M., Boucherie, H., Toledano, M. B. and Labarre, J., 1998. The H_2O_2 stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 273, 22480-22489.
- Gonzalez E, Fernandez MR, Larroy C, Sola L, Pericas MA, Pares X, Biosca JA. 2000. Characterization of a (2R,3R)-2,3-butanediol dehydrogenase as the *Saccharomyces cerevisiae* YAL060W gene product. Disruption and induction of the gene. *J Biol Chem* 275, 35876–35885.
- Grabowska, D. and Chelstowska, A., 2003. The *ALD6* gene product is indispensable for providing NADPH in yeast cells lacking glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *J. Biol. Chem.* 278, 13984-13988.
- Hagenauer-Hener, U., Henn, D., Dettmar, F., Mosandl, A. and Schmitt, A., 1990. Direct determination of 2,3-butanediol stereoisomers in wine. *Dtsch. Lebensm.-Rundsch* 86, 273-276.
- Herbert, D., Philips, P. J., Strange, R. E., 1971. Chemical analysis of microbial cells. *Methods Microbiol.* 58, 344.
- Herrero, E., Ros, J., Bellí, G. and Cabisco, E., 2008. Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Bioch. Biophys. Acta* 1780, 1217-1235.
- Heux S., Cachon R. and Dequin S, 2006. Cofactor engineering in *Saccharomyces cerevisiae*: expression of a H_2O -forming NADH oxidase and impact on redox metabolism. *Metab. Eng.* 8:303-314.
- Hohmann S., 2002. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2, 300-72.
- Hou, J., Lages NF, Oldiges M, Vemuri GN., 2009. Metabolic impact of redox cofactor perturbations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabol. Eng.* 11, 253-261.
- Kim S., Huh W.K., Lee B.H., Kang S.O., 1998. D-arabinose dehydrogenase and its gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1429, 29-39.
- Kuhn, A., van Zyl, C., van Tonder, A. and Prior, B. A., 1995. Purification and partial characterization of an aldo-keto reductase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1580-1585.
- Lagunas, R. and Gancedo, J. M., 1973. Reduced pyridine nucleotides balance in glucose growing *saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 37, 90-94.
- Lange, H. C. and Heijnen, J. J., 2001. Statistical reconciliation of the elemental and molecular biomass composition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 75, 334-344.
- Laroche, M., Drouin, S., Robert, F. and Turcotte, B., 2006. Oxidative stress-activated zinc cluster protein Stb5 has dual activator/repressor functions required for pentose phosphate pathway regulation and NADPH production. *Mol. Cell. Biol.* 26, 6690-6701.
- Leão, C. and Van Uden, N., 1984. Effects of ethanol and other alkanols on passive proton influx in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioch. Biophys. Acta* 774, 43-48.
- Llobell, A., Lopez-Ruiz, A., Peinado, J. and Lopez-Barea, J., 1988. Glutathione reductase directly mediates the stimulation of yeast glucose-6-phosphate dehydrogenase by GSSG. *Biochem. J.* 249, 293-296.
- Ma, M. and Liu, Z. L., 2010. Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 829-845.
- Martínez-Muñoz, G. A. and Kane, P., 2008. Vacuolar and plasma membrane proton pumps collaborate to achieve cytosolic pH homeostasis in yeast. *J. Biol. Chem.*

- 283, 20309-20319.
- Meaden, P. G., Dickinson, F. M., Mifsud, A., Tessier, W., Westwater, J., Bussey, H. and Midgley, M., 1997. The *ALD6* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a cytosolic, Mg^{2+} activated acetaldehyde dehydrogenase. *Yeast* 13, 1319-1327.
- Minard, K. I. and McAlister-Henn, L., 2005. Sources of NADPH in yeast vary with carbon source. *J. Biol. Chem.* 280, 39890-39896.
- Molin, M., Norbeck, J. and Blomberg, A., 2003. Dihydroxyacetone kinases in *Saccharomyces cerevisiae* are involved in detoxification of dihydroxyacetone. *J. Biol. Chem.* 278, 1415-1423.
- Moreira dos Santos, M., Raghevendran, V., Kötter, P., Olsson, L., Nielsen, J., 2004. Manipulation of malic enzyme in *Saccharomyces cerevisiae* for increasing NADPH production capacity aerobically in different cellular compartments. *Met. Eng.* 6, 352-363.
- Nakamura K., Kondo S., Kawai Y., nakajima n., Ohno A., 1997. Amino acid sequence and characterization of aldo-keto reductase from baker's yeast. *Biosc. Biotechnol. Biochem.* 61, 375-377.
- Nevoigt, E., 2008. Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72, 379-412.
- Nesterov, Y. and Nesterov, I. U. E., 2004. *Introductory lectures on convex optimization: A basic course*. Springer.
- Nissen, T. L., Schulze, U., Nielsen, J. and Villadsen, J., 1997. Flux distributions in anaerobic, glucose-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 143, 203 - 218.
- Nissen, T.L., Anderlund M., Nielsen J., Villadsen J. and Kielland-Brandt M.C. (2001) Expression of a cytoplasmic transhydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae* results in formation of 2-oxoglutarate due to depletion of the NADPH pool.
- Nookaew, I., Jewett, M. C., Meechai, A., Thammarongtham, C., Laoteng, K., Cheevadhanarak, S., Nielsen, J. and Bhumiratana, S., 2008. The genome-scale metabolic model iIN 800 of *Saccharomyces cerevisiae* and its validation: a scaffold to query lipid metabolism. *BMC Syst. Biol.* 2, 71.
- Norbeck, J. and Blomberg, A., 1997. Metabolic and regulatory changes associated with growth of *Saccharomyces cerevisiae* in 1.4 M NaCl. *J. Biol. Chem.* 272, 5544-5554.
- Nordström, K., 1968. Yeast growth and glycerol formation. II. Carbon and redox balances. *J Inst Brew* 74, 429-432.
- Oechsner, U., Magdolen, V. and Bandlow, W., 1988. A nuclear yeast gene (GCY) encodes a polypeptide with high homology to a vertebrate eye lens protein. *FEBS Lett.* 238, 123-128.
- Orij, R., Brul, S. and Smits, G. J., 2011. Intracellular pH is a tightly controlled signal in yeast. *Bioch. Biophys. Acta* 1810, 933-44.
- Oura, E., 1977. Reaction products of yeast fermentations. *Process Biochem* 12, 19-21.
- Penninckx, M. J., 2002. An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non conventional yeasts. *FEMS Yeast Res.* 2, 295-305.
- Remize, F., Cambon, B., Barnavon, L. and Dequin, S., 2003. Glycerol formation during wine fermentation is mainly linked to Gpd1p and is only partially controlled by the HOG pathway. *Yeast* 20, 1243-1253.
- Remize, F., Roustan, J. L., Sablayrolles, J. M., Barre, P. and Dequin, S., 1999. Glycerol overproduction by engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains leads to substantial changes in by-product formation and to a stimulation of fermentation rate in stationary phase. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 143.
- Roustan, J. L. and Sablayrolles, J. M., 2002. Modification of the acetaldehyde concentration during alcoholic fermentation and effects on fermentation kinetics. *J. Biosc. Bioeng.* 93, 367-375.
- Saint-Prix, F., Bönquist, L. and Dequin, S.,

2004. Functional analysis of the *ALD* gene family of *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic growth on glucose: the NADP⁺-dependent Ald6p and Ald5p isoforms play a major role in acetate formation. *Microbiology* 150, 2209-2220.
- Sainz, J., Pizarro, F., Perez-Correa, J. R. and Agosin, E., 2003. Modeling of yeast metabolism and process dynamics in batch fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 81, 818-828.
- Sambrook, J. F. and Fritsch, E. and Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sazanov, L. A. and Jackson, J. B., 1994. Proton-translocating transhydrogenase and NAD- and NADP-linked isocitrate dehydrogenases operate in a substrate cycle which contributes to fine regulation of the tricarboxylic acid cycle activity in mitochondria. *FEBS Lett.* 344, 109-116.
- Scanes, K. T., Hohmann, S. and Prior, B. A., 1998. Glycerol production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its relevance to wine: a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic* 19, 17-24.
- Schiestl, R. H. and Gietz, R. D., 1989. High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Cur. Genet.* 16, 339-346.
- Slekar, K. H., Kosman, D. J. and Culotta, V. C., 1996. The yeast copper/zinc superoxide dismutase and the pentose phosphate pathway play overlapping roles in oxidative stress protection. *J. Biol. Chem.* 271, 28831-28836.
- Valadi, Å., Granath, K., Gustafsson, L. and Adler, L., 2004. Distinct intracellular localization of Gpd1p and Gpd2p, the two yeast isoforms of NAD⁺-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase, explains their different contributions to redox-driven glycerol production. *J. Biol. Chem.* 279, 39677-39685.
- Vallino, J. and Stephanopoulos, G., 1993. Metabolic flux distributions in *Corynebacterium glutamicum* during growth and lysine overproduction. *Biotech. Bioeng.* 41, 633-646.
- van der Donk, W. and Zhao, H., 2003. Recent developments in pyridine nucleotide regeneration. *Curr. Opinion Biotech.* 14, 421-426.
- van Dijken, J. P. and Scheffers, W. A., 1986. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* 32, 199-224.
- Vaseghi, S., Baumeister, A., Rizzi, M. and Reuss, M., 1999. *In vivo* dynamics of the pentose phosphate pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.* 1, 128 - 140.
- Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W. A. and Dijken, J. P., 1990. Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. *J. Gen. Microbiol.* 136, 395-403.
- Verduyn, C., Stouthamer, A. H., Scheffers, W. A. and Dijken, J. P., 1991. A theoretical evaluation of growth yields of yeasts. *Antonie Leeuwenhoek* 59, 49-63.
- Vido, K., Spector, D., Lagniel, G., Lopez, S., Toledano, M. B. and Labarre, J., 2001. A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 276, 8469-8474.
- von Jagow, G. and Klingenberg, M., 1970. Pathways of hydrogen in mitochondria of *Saccharomyces carlsbergensis*. *Eur. J. Biochem.* 12, 583-592.

Supplementary files

Supplementary file 1 – *DynamoYeast* model and assumptions

To develop *DynamoYeast*, a curated model of yeast fermentative metabolism, various assumptions based on data in the literature and on existing knowledge were made, and are presented below.

Central carbon metabolism in fermentation on glucose

To describe yeast metabolism in fermentation conditions, we set to zero all reactions involved in gluconeogenesis (those involving fructose-1,6-biphosphatase, glycerol kinase, glycerol-3-phosphate, alcohol dehydrogenase 2 and the glyoxylate cycle) and the reactions related to oxygen uptake and the respiratory chain were not included in the metabolic network. A characteristic of the TCA cycle in anaerobic conditions is the synthesis of succinate by two separate branches: the reductive and oxidative branch (Nissen et al., 1997; Camarasa et al., 2003). Consequently, we set to zero the succinate dehydrogenase complex. The metabolites of TCA with the exception of succinyl-CoA are found both in the cytosol and in the mitochondria. However, in anaerobic conditions, the citrate synthase Cit1p and succinyl-CoA ligase (Lscp complex) are only present in mitochondria (Kim et al., 1986; Przybyla-Zawislak et al., 1998) and the cytosolic NADP⁺-dependent isocitrate deshydrogenase is not active. The flux through these reactions were constrained to zero in the model (Grabowska and Chelstowska, 2003; Minard and McAlister-Henn 2005). Finally, the cofactor FADH₂ was not included in the model because the quinone reactions involved in the reoxidation of FADH₂ were not considered.

Biomass composition and synthesis

The biomass equation is an important component in constraint-based modeling, because the drain of metabolic precursors and the NADPH and NAD⁺ requirements depend on this equation (Mo et al., 2009; Kuepfer et al., 2005; Pramanick et al., 2000). In particular, the demands for NAD⁺ and NADPH strongly constrain the glycerol and PP pathway, respectively. As the localization of biosynthetic reactions for biomass may have a significant

effect on the cytosolic and mitochondrial redox balance, the compartmentalization of amino acids synthesis pathways was carefully selected.

Moreover, biomass composition varies with environmental conditions and between yeast strains (Gombert et al., 2001; Sainz et al., 2003; Nookaew et al., 2008). To accurately predict the redox requirement for biomass, we measured the biomass composition of the strain NADPH-Bdh without perturbation (no acetoin) and determined the corresponding biomass equation at 60 % of biomass (supplementary file 2, Table S2.1, Table S2.2).

ATP maintenance in fermentation

We calculated the cost in ATP for the transporters mitochondrial (corresponding to oxaloacetate, pyruvate and glutamate carriers which are co-transported with H^+ and malate and succinate carriers which are co-transported with phosphate) and for that acetate export. The phosphate/ H^+ antiporter is aggregated and is reported in the model as a proton symport reaction.. For each proton imported in the cytosol or the mitochondria, a proton must be expelled to maintain pH homeostasis inside the compartment, which is performed in yeast by membrane ATPases. We assumed a ratio of one ATP consumed per proton. Moreover, as most of the weak organic acids have a pKa below 7 and are in a dissociated form in the cytosol, the ATP consumption associated with these mechanisms was taken into account in our model by the addition of consumption of two moles of ATP per weak organic acid exported: one ATP is consumed for the export of the dissociated acid and one ATP for the export of a proton.

Validation of *DynamoYeast* model

The validation has been performed in three steps:

- (i) We performed predictions of *DynamoYeast* model of the lethality of deletion mutants for all genes of carbon central metabolism. To simulate the effect of a single gene deletion, the fluxes through the corresponding reactions were constrained to zero for all time points of the fermentation. For each essential gene of central carbon metabolism, we correctly predicted the lethality of the strain.
- (ii) We assessed the predictive performance of the *DynamoYeast* model by comparing results

from validated models reported in the literature or with experimental data (Nissen et al., 1997, Albers et al, 1996). *DynamoYeast* predicted data with less than 5 % error compared to literature.

(iii) Then we tested the model on our data sets representing 5 conditions of NADPH demand (0, 100, 200, 300 and 400 mM acetoin) for 10 to 14 time points of fermentation. We were able to reconcile all extracellular metabolites for all time points of the fermentation and for each condition, showing the consistency of the stoichiometric network used in *DynamoYeast*.

List of *DynamoYeast* reactions

The list of the central carbon metabolism reactions of the metabolic network are described below.

Rxn	Equation	Reversibility	Proteins	Rxn_ID_Model	Notes
Input Extracellular transport					
GLC_up	GLC_xt = GLC	N	Hxt1p	IR141	Glucose uptake
FRUC_up	FRUC_xt = FRUC	N	Hxt1p	IR158	Fructose uptake
ACETO_up	ACETO_xt=ACETO	N		IR207	Acetoin uptake
Output Extracellular transport					
2_3_BUTA_out	2_3_BUTA_xt=2_3_BUTA	Y		IR206	Butanediol output
GL_out	GL_xt=GL	Y		IR211	Glycerol output
ACET_out	ACET_xt=ACET	Y		IR198	Acetate output
PYR_out	PYR_xt=PYR	Y		IR199	Pyruvate output
AKG_out	AKG_xt=AKG	Y		IR201	α -ketoglutarate output
SUCC_out	SUCC_xt = SUCC	Y		IR203	Succinate output
CO2_out	CO2 = CO2_xt	Y		IR219	CO2 output
ETH_out	ETH_xt = ETH	Y		IR197	Ethanol output
Glycolysis					
FRUC_F6P	FRUC + ATP = F6P + ADP	Y	Hxk2p	IR180	Fructose phosphorylation
GLC_G6P	GLC + ATP = G6P + ADP	Y	Hxk2p	IR2	Glucose phosphorylation
G6P_F6P	G6P = F6P	N	Pgi1p	IR4	Phosphoglucosomerase
F6P-1,6FDP	F6P + ATP = 1,6FDP + ADP	Y	Pfk1p	IR5	Phosphofructokinase
1,6FDP_DHAP+G3P	1,6FDP = DHAP + G3P	Y	Fba1p	IR7	Aldolase
DHAP=G3P	DHAP=G3P	N	Tpi1p	IR8	Topoisomerase
G3P-13PDG	G3P + NAD = 1,3PDG + NADH	N	Tdh1p	IR9	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
13PDG-3PG	13PDG+ADP=3PG+ATP	Y	Pgk1p	IR12	Phosphoglycerate kinase
3PG-2PG	3PG=2PG	N	Gpm1p	IR13	Phosphoglycerate mutase
2PG-PEP	2PG=PEP	N	Eno1p	IR16	Enolase
PEP_PYR	PEP + ADP = PYR + ATP	Y	Cdc19p	IR18	Pyruvate kinase
PPP					
G6P_6PGL	G6P + NADP =6PGL+NADPH	Y	Zwf1p	IR20	PPP oxidatif 1
6PGL_6PG	6PGL=6PG	N	Sol3p	IR21	PPP oxidatif 2
6PGL_RL5P	6PG+NADP=RL5P+NADPH+CO2	Y	Gnd1p	IR23	PPP oxidatif 3
RL5P_R5P	RL5P=R5P	N	Rki1p	IR26	PPP reversible 1
RL5P_X5P	RL5P=X5P	N	Rpe1	IR25	PPP reversible 2
R5P_S7P	X5P+R5P = S7P + G3P	N	Tkl1p	IR27	PPP reversible 3
S7P_E4P	S7P + G3P = F6P + E4P	N	Tal1p	IR30	PPP reversible 4
R5P_F6P	X5P + E4P = F6P + G3P	N	Tkl1p	IR29	PPP reversible 5
Glycerol pathway					
DHAP=GL3P	DHAP+NADH=GL3P+NAD	Y	Gpd1p	IR36	Glycerol formation
GL3P_GL	GL3P = GL	Y	Rhr2p/Gpp1p	IR38	Glycerol formation
GL-DHA	GL+NAD=DHA+NADH	N	Gcy1p	IR40	Cycle DHAP
DHA-DHAP	DHA+ATP=DHAP+ADP	N	Dak1p	IR41	Cycle DHAP
Pyruvate node					
PYR_ACAL	PYR = ACAL + CO2	Y	Pdc1p	IR46	Acetaldehyde formation
ACAL_ETH	ACAL + NADH = ETH + NAD	N	Adh1p	IR49	Ethanol formation
ETH_ACAL	ETH + NAD = ACAL+ NADH	N	Adh2p	IR51	Ethanol degradation
ACAL_ACETO	2ACAL=ACETO	N	Pdc1p	IR188	Acetoin formation
ACETO_BUT	ACETO+NADH=BUT+NAD	N	Bdh1p	IR53	Butanediol formation
ACETO_BUT	ACETO+NADPH=BUT+NADP	N	NADPH-Bdh1p	IR138	Butanediol formation modified
ACAL_ACET_nadp	ACAL + NADP = ACET + NADPH	Y	Ald6p	IR57	NADP-dependant acetate formation
ACAL_ACET_nad	ACAL + NAD = ACET + NADH	Y	Ald3p	IR55	NAD-dependant acetate formation
ACET_ACCOA	ACET + 2ATP + COA = ACCOA +	Y	Acs1p	IR59	Acetyl-CoA formation
PYR_OAA	PYR + CO2 + ATP = OAA + ADP	Y	Pyc1p	IR62	Anaplerotic formation of oxaloacetate
Cytosolic TCA					
OAA_MAL_nadh	OAA + NADH = MAL + NAD	Y	Mdh2p	IR67	Malate dehydrogenase fermentation
MAL_FUM	MAL=FUM	Y	Fum1p	IR68	Fumarate formation
FUM_SUCC	FUM = SUCC	Y	Frd5p	IR69	Succinate formation / TCA reductive branch
CIT_ICIT	CIT=ICIT	Y	Aco1p	IR65	Isocitrate formation
ICIT_AKG_nadp	ICIT + NADP = AKG + NADPH + CO2	Y	Idp2p	IR66	α -ketoglutarate formation
AKG_GLU	AKG + NADPH = GLU + NADP	Y	Gdh1p	IR72	Glutamate formation

Rxn	Equation	Reversibility	Proteins	Rxn ID	Model	Notes
Mitochondrial reactions						
PYRm_ACCOA_m	PYR_m + NAD_m + COAm = ACCOA_m + NADH_m + CO2m	Y	Pdh complex	IR82		Mitochondrial acetyl-CoA formation
OAAm_CITm	OAAm + ACCOA_m = ICITm + COAm	N	Cit1p	IR92		Citrate formation / TCA oxidative branch
CITm_ICITm	CITm=ICITm	N	Aco1p	IR95		Isocitrate formation
ICITm_AKGm_nad_m	ICIT + NAD_m = AKG + NADH_m + CO2	Y	Idh1/2p complex	IR97		α -ketoglutarate formation
ICITm_AKGm_nadp_m	ICITm + NADP_m = AKG m+ NADPH_m + CO2m	Y	Idp1p	IR98		α -ketoglutarate formation
AKGm_SUCCOAm	AKGm + NAD_m +CoAm = SUCCOAm + NADH_m + CO2m	Y	Akgdhp complex	IR99		Succinate formation / TCA oxidative branch
SUCCOAm_SUCCm	SUCCOAm+ADPm=SUCCm+ATPm+CoAm	N	Lsc1/2p complex	IR100		Succinate formation / TCA reductive branch
MALm_PYRm	MALm + NADP_m = PYR_m + CO2m + NADPH_m	Y	Mae1p	IR106		Malic enzyme
OAA_MAL_nadh_m	OAA + NADH_m = MAL + NAD_m	Y	Mdh1p	IR102		Malate dehydrogenase fermentation
MALm_FUMm	MALm=FUMm	N	Fum1p	IR103		Fumarate formation
FUMm_SUCCm	FUMm = SUCCm	Y	Osm1p	IR104		Succinate formation / TCA reductive branch
SUCCm_FUMm	SUCCm=FUMm	Y	Sdh complex	IR105		Fumarate formation
ACALm_ETHm	ACALm + NADHm = ETHm + NADm	N	Adh3p	IR83		Ethanol formation
ACAL_ACET_nadp_m	ACAL + NADP_m = ACET + NADPH_m	N	Ald5p	IR87		NADP-dependant acetate formation
ACAL_ACET_nad_m	ACAL + NAD_m = ACET + NADH_m	N	Ald4p	IR85		NAD-dependant acetate formation
ACETm_ACCOAm	ACETm + 2 ATPm + COAm = ACCOAm + 2 ADPm	Y	Acs1p	IR58		ACCOA formation
AKGm_GLUm	AKGm + NADPH_m = GLUm + NADP_m	Y	Gdh3p	IR107		Glutamate formation
GLUm_AKGm	GLUm+NADm=AKGm+NADHm	Y	Gdh2p	IR73		α -ketoglutarate formation
Mitochondrial carriers						
PYR_PYRm	PYR +H ⁺ = PYR_m +H ⁺ m	Y		IR116		Pyruvate transport to mitochondria
ACCOA_ACCOA_m	ACCOA = ACCOA_m	Y	Crc1p	IR220		Mitochondrial import acetyl-CoA
SUCC_SUCCm	SUCC+Pim=SUCCm+Pic	N	Dic1p	IR113		Succinate import
MAL_MALm	MAL+Pim=MALm+Pi	N	Dic1p	IR114		Malate import
MAL_SUCCm	MAL+SUCCm=MALm+SUCC	Y	Dic1p	IR115		Malate_Succinate antiport
OAA_OAAm	OAA+H ⁺ =OAAm+H ⁺ m	Y	Oac1p	IR121		Oxaloacetate transport, mitochondrial
ETOH_ETOHm	ETOH=ETOHm	N		IR126		Ethanol transport to mitochondria (diffusion)
ACAL_ACALm	ACAL=ACALm	N		IR60		Acetaldehyde transport to mitochondria (diffusion)
CO2_CO2m	CO2 = CO2_m	N		IR129		CO2 transport (diffusion), mitochondrial
ICITm_CIT	ICITm+CIT= CITm+ICIT	Y	Ctp1p	IR130		Citrate transport, mitochondrial
MALm_CIT	MALm+CIT= CITm+MAL	N	Ctp1p	IR132		Citrate transport, mitochondrial
ATP_ATPm	ADPm+ATP+H=ADP+ATPm+Hm	Y	Aac3p	IR133		ADP/ATP transport, mitochondrial
ACET_ACETm	ACET=ACETm	N		IR136		Acetate transport, mitochondrial
AKG_AKGm	AKG=AKGm	N	Odc1p	IR120		α -ketoglutarate/2-oxodicarboxylate transporter modified, mitochondrial
GLU_GLUm	GLU+H ⁺ =GLUm+H ⁺ m	N	Agc1p	IR235		L-glutamate reversible transport via proton symport, mitochondrial
AKG_CITm	AKG+CITm+CO2=AKGm+CIT+CO2m	N	Yhm2p	IR61		α -ketoglutarate/citrate transport mitochondrial
NAD(H) kinases						
Utr1 and Yef1	NAD+ATP=NADP+ADP	Y	Utr1p	IR226		NADH kinase
Utr1 and Yef1	NADH+ATP=NADPH+ADP	Y	Utr1p	IR227		NADH kinase
Pos5	NADHm+ATPm=NADPm+ADPm	Y	Pos5p	IR228		NADH kinase

Biomass reactions

Amino acids biosynthesis	Equation
Alanine	$\text{PYR}_m + \text{NADPH} = \text{ALA} + \text{NADP}$
Arginine	$\text{AKG} + 3 \text{ NADPH} + \text{NADPH}_m + \text{NAD} + \text{CO}_2 + 7 \text{ ATP} + \text{ACCOA}_m + \text{ATP}_m = \text{ARG} + 3 \text{ NADP} + \text{NADP}_m + \text{NADH} + 7 \text{ ADP} + \text{COA}_m + \text{ADP}_m$
Asparagine	$\text{OAA} + \text{NADPH} + 3 \text{ ATP} = \text{ASN} + \text{NADP} + 3 \text{ ADP}$
Aspartate	$\text{OAA} + \text{NADPH} = \text{ASP} + \text{NADP}$
Cysteine	$3\text{PG} + 1 \text{ NAD} + 5 \text{ NADPH} + 5 \text{ ATP} = \text{CYS} + \text{NADH} + 5 \text{ NADP} + 5 \text{ ADP}$
Glutamine	$\text{AKG} + \text{NADPH} + \text{ATP} = \text{GLN} + \text{NADP} + \text{ADP}$
Histidine	$\text{R5P} + \text{CO}_2 + 3 \text{ NAD} + 3 \text{ NADPH} + 6 \text{ ATP} = \text{HIS} + 3 \text{ NADH} + 3 \text{ NADP} + 6 \text{ ADP}$
Isoleucine	$\text{OAA} + \text{PYR}_m + 4 \text{ NADPH} + \text{NADPH}_m + 2 \text{ ATP} = \text{ILE} + \text{CO}_2 + 4 \text{ NADP} + \text{NADP}_m + 2 \text{ ADP}$
Leucine	$2 \text{ PYR}_m + \text{ACCOA}_m + \text{NADPH}_m + \text{NADPH} + \text{NAD} = \text{LEU} + \text{NADP}_m + \text{NADP} + \text{NADH} + \text{CO}_2 + \text{COA}$
Lysine	$\text{AKG} + \text{ACCOA}_m + \text{NAD}_m + \text{NAD} + 4 \text{ NADPH} = \text{LYS} + \text{COA} + \text{CO}_2 + \text{NADH}_m + \text{NADH} + 4 \text{ NADP}$
Methionine	$\text{OAA} + 7 \text{ NADPH} + 7 \text{ ATP} = \text{MET} + 7 \text{ NADP} + 7 \text{ ADP}$
Phenylalanine	$\text{E4P} + 2 \text{ PEP} + 2 \text{ NADPH} + \text{ATP} = \text{PHE} + 2 \text{ NADP} + \text{ADP} + \text{CO}_2$
Proline	$\text{AKG} + 3 \text{ NADPH} + \text{ATP} = \text{PRO} + 3 \text{ NADP} + \text{ADP}$
Serine	$3\text{PG} + \text{NAD} + \text{NADPH} = \text{SER} + \text{NADH} + \text{NADP}$
Threonine	$\text{OAA} + 3 \text{ NADPH} + 2 \text{ ATP} = \text{THR} + 3 \text{ NADP} + 2 \text{ ADP}$
Tryptophane	$\text{E4P} + \text{PEP} + \text{R5P} + 2 \text{ NADPH} + 2 \text{ NAD} + 5 \text{ ATP} = \text{TRP} + \text{CO}_2 + 2 \text{ NADP} + 2 \text{ NADH} + 5 \text{ ADP}$
Tyrosine	$\text{E4P} + 2 \text{ PEP} + \text{NADPH} + \text{ATP} = \text{TYR} + \text{NADP} + \text{ADP} + \text{CO}_2$
Valine	$2 \text{ PYR}_m + \text{NADPH}_m + \text{NADPH} = \text{VAL} + \text{NADP}_m + \text{NADP} + \text{CO}_2$
Glycine via serine	$3\text{PG} + 1 \text{ NAD} + 2 \text{ NADPH} = \text{GLY} + 1 \text{ NADH} + 2 \text{ NADP}$
Glycine via threonine	$\text{OAA} + 3 \text{ NADPH} + 2 \text{ ATP} = \text{GLY} + \text{ACAL} + 3 \text{ NADP} + 2 \text{ ADP}$
ADN/ARN biosynthesis	Equation
dAMP	$\text{R5P} + \text{G3P} + 9 \text{ ATP} + 4 \text{ NADc} + 7 \text{ NADPHc} + 3 \text{ CO}_2 \rightarrow \text{dAMP} + 9 \text{ ADP} + 7 \text{ NADPc} + 4 \text{ NADHc}$
dTMP	$\text{R5P} + \text{OAA} + 7 \text{ ATP} + \text{NADc} + 2 \text{ NADPHc} + \text{CO}_2 \rightarrow \text{dTMP} + 7 \text{ ADP} + 2 \text{ NADPc} + \text{NADHc}$
dGMP	$\text{R5P} + \text{G3P} + 11 \text{ ATP} + 4 \text{ NADc} + 6 \text{ NADPHc} + 3 \text{ CO}_2 \rightarrow \text{dGMP} + 11 \text{ ADP} + 6 \text{ NADPc} + 4 \text{ NADHc}$
dCMP	$\text{R5P} + \text{OAA} + 7 \text{ ATP} + \text{NAD} + 2 \text{ NADPH} \rightarrow \text{dCMP} + 7 \text{ ADP} + \text{NADH} + 2 \text{ NADP}$
UMP	$\text{R5P} + \text{OAA} + 5 \text{ ATP} + \text{NADc} + \text{NADPHc} \rightarrow \text{UMP} + 5 \text{ ADP} + \text{NADH} + \text{NADP}$
GMP	$\text{R5P} + \text{G3P} + 11 \text{ ATP} + 4 \text{ NADc} + 5 \text{ NADPHc} + 3 \text{ CO}_2 \rightarrow \text{GMP} + 11 \text{ ADP} + 5 \text{ NADPc} + 4 \text{ NADHc}$
CMP	$\text{R5P} + \text{OAA} + 7 \text{ ATP} + \text{NADc} + \text{NADPHc} + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CMP} + 7 \text{ ADP} + \text{NADPc} + \text{NADHc}$
AMP	$\text{R5P} + \text{G3P} + 3 \text{ CO}_2 + 9 \text{ ATP} + 4 \text{ NAD} + 6 \text{ NADPHc} \rightarrow \text{AMP} + 9 \text{ ADP} + 4 \text{ NADHc} + 6 \text{ NADPc}$
Fatty acid biosynthesis	Equation
A10-ACP	$5 \text{ ACCOA} + 8 \text{ ATP} + 5 \text{ NADPH} + 3 \text{ NADH} = \text{A10_0_ACP} + 8 \text{ ADP} + 5 \text{ NADP} + 3 \text{ NAD} + 5 \text{ COA}$
A12-ACP	$6 \text{ ACCOA} + 10 \text{ ATP} + 6 \text{ NADPH} + 4 \text{ NADH} = \text{A12_0_ACP} + 10 \text{ ADP} + 6 \text{ NADP} + 4 \text{ NAD} + 6 \text{ COA}$
A14-ACP	$7 \text{ ACCOA} + 12 \text{ ATP} + 7 \text{ NADPH} + 5 \text{ NADH} = \text{A14_0_ACP} + 12 \text{ ADP} + 7 \text{ NADP} + 5 \text{ NAD} + 7 \text{ COA}$
A16-ACP	$8 \text{ ACCOA} + 14 \text{ ATP} + 8 \text{ NADPH} + 6 \text{ NADH} = \text{A16_0_ACP} + 14 \text{ ADP} + 8 \text{ NADP} + 6 \text{ NAD} + 8 \text{ COA}$
A18-ACP	$9 \text{ ACCOA} + 16 \text{ ATP} + 9 \text{ NADPH} + 7 \text{ NADH} = \text{A18_0_ACP} + 16 \text{ ADP} + 9 \text{ NADP} + 7 \text{ NAD} + 9 \text{ COA}$
Triglycerides synthesis	$3 \text{ AG_ACP} + \text{G3P} + \text{NADH} = \text{TRIGLY} + \text{NAD}$
Phosphatidyl acids synthesis	$\text{G3P} + \text{NADH} + 2 \text{ AG_ACP} = \text{PA} + \text{NAD}$
Phosphatidyl choline	$2 \text{ G3P} + 4 \text{ ATP} + \text{NAD} + \text{NADPH} + 2 \text{ AG_ACP} = \text{PC} + 4 \text{ ADP} + \text{NADP} + \text{NADH}$
Phosphatidyl serine	$2 \text{ G3P} + \text{ATP} + \text{NAD} + \text{NADPH} + 2 \text{ AG_ACP} = \text{PS} + \text{ADP} + \text{NADP} + \text{NADH}$
Phosphatidyl ethanolamine	$2 \text{ G3P} + \text{ATP} + \text{NAD} + \text{NADPH} + 2 \text{ AG_ACP} = \text{PE} + \text{ADP} + \text{NADP} + \text{NADH}$
Phosphatidyl inositol	$\text{G3P} + \text{G6P} + 2 \text{ ATP} + \text{NADH} + 2 \text{ AG_ACP} = \text{PINS} + 2 \text{ ADP} + \text{NAD}$
	$\text{AG-ACP} \rightarrow 1,7 \text{ ACCOAc} + 3 \text{ ATP} + 1,7 \text{ NADPHc} + 1,2 \text{ NADHc}$
Carbohydrates synthesis	Equation
Carbohydrates	$\text{G6P} + \text{ATP} \rightarrow \text{CARBH} + \text{ADP}$

Supplementary file 2 – Cellular composition of the strain 59A NADPH-Bdh.

Amino acid, lipid and carbohydrate composition of *Saccharomyces cerevisiae* strain 59A NADPH-Bdh during exponential growth ($OD_{600\text{ nm}}$ 3.5) in batch fermentation cultures on 2x SD, 10 % glucose. We used the ribonucleotide monomer composition determined by Sainz et al. (2003).

	Cellular content (%, w/w)
Carbohydrates	54.0
Lipids	3.7
Proteins	31.0
RNA	4.9
DNA	0.5
Ashes	5.9

Table S2.1 Cellular composition of *S. cerevisiae* strain NADPH-Bdh

Amount (mmol.gDW ⁻¹)		Amount (mmol.gDW ⁻¹)	
Amino acids		DNA	
Alanine	0.204	dAMP	0.004
Arginine	0.106	dTMP	0.004
Asparagine	0.102	dGMP	0.003
Aspartate	0.205	dCMP	0.003
Cysteine	0.053	RNA	
Glutamate	0.136	UMP	0.052
Glutamine	0.105	GMP	0.040
Glycine via serine	0.187	CMP	0.039
Glycine via threonine	0.187	AMP	0.040
Histidine	0.047	Lipids	
Isoleucine	0.114	Triglycerides	0.004
Leucine	0.176	Phosphatidyl choline	0.005
Lysine	0.180	Phosphatidyl serine	0.001
Methionine	0.032	Phosphatidyl	0.004
Phenylalanine	0.079	ethanolamine	0.004
Proline	0.079	Phosphatidyl inositol	0.004
Serine	0.157	Carbohydrates	
Threonine	0.133	Carbohydrates	2.22
Tryptophane	0.026		
Tyrosine	0.024		
Valine	0.207		

Table S2.2 Amino acid, ribonucleotide monomer, lipid and carbohydrate composition (mmol per gram of biomass) of strain 59A NADPH-Bdh.

mmol.gDW ⁻¹ .h ⁻¹	NADH	NADPH	ATP
Amino acids	0.959	-4.747	-2.967
RNA/DNA	0.444	-0.587	-1.745
Fatty acids	0.002	-0.018	-0.218
Carbohydrates	0.000	0.000	-4.041
TOTAL	1.405	-5.352	-8.971

Table S2.3 Pyridine nucleotides and energy required (mmol per gram of biomass) for biomass synthesis from metabolic precursors by strain 59A NADPH-Bdh.

Supplementary file 3 – Theoretical calculation of glycerol production

Amino acids	mol/mol NADH produced	mmol/ gDW	Total NADH produced mmol/gDW
Alanine	1	0.204	0.204
Arginine	3	0.106	0.318
Asparagine	1	0.102	0.102
Aspartate	1	0.205	0.205
Cystéine	2	0.053	0.106
Glutamate	1	0.136	0.136
Glutamine	2	0.105	0.210
Glycine	1	0.187	0.187
Histidine	3	0.047	0.141
Isoleucine	2	0.114	0.228
Leucine	4	0.176	0.704
Lysine	3	0.181	0.542
Methionine	1	0.032	0.032
Phenylalanine	0	0.079	0.000
Proline	2	0.079	0.158
Serine	2	0.157	0.314
Thréonine	1	0.133	0.133
Tryptophane	3	0.026	0.078
Tyrosine	2	0.024	0.048
Valine	2	0.207	0.414
TOTAL			4.260
Ribonucleotides	mol/mol NADH produced	mmol/ gDW	Total NADH produced mmol/gDW
DNA			
dAMP	4	0.004	0.014
dTMP	2	0.004	0.007
dGMP	4	0.003	0.012
dCMP	2	0.003	0.006
RNA			
UMP	2	0.052	0.104
GMP	4	0.040	0.160
CMP	2	0.039	0.078
AMP	4	0.040	0.160
TOTAL			0.542

Table S3.1 NADH produced (mmol per gram of biomass) by biomass synthesis pathways from glucose in 59A NADPH-Bdh strain.

The amount of NADH produced for biomass can be calculated as follows:

$$\text{NADH biomass} = \sum \beta_i^{\text{NADH}} \times q_i^{\text{biomass}}$$

β_i^{NADH} : stoichiometric coefficient of NADH in the aggregated i -th reactions
 q_i^{biomass} : amount of mass (in mmol/gDW) related to the i -th reactions

$$\text{NADH biomass} = 4.26 + 0.542 = 4.8 \text{ mmol/gDW}$$

By-products	mol/mol NADH produced	mmol/ gDW	Total NADH produced mmol/gDW
Acetate	1	2.16	2.16
Pyruvate	1	0.27	0.27
α -ketoglutarate	1	0.03	0.03
TOTAL			2.46

Table S3.2 NADH production (mmol per gram of biomass) associated to the formation of by-products from glucose in 59A NADPH-Bdh strain.

$$\text{NADH byproducts} = \sum \alpha_i^{\text{NADH}} \times q_i^{\text{byproducts}}$$

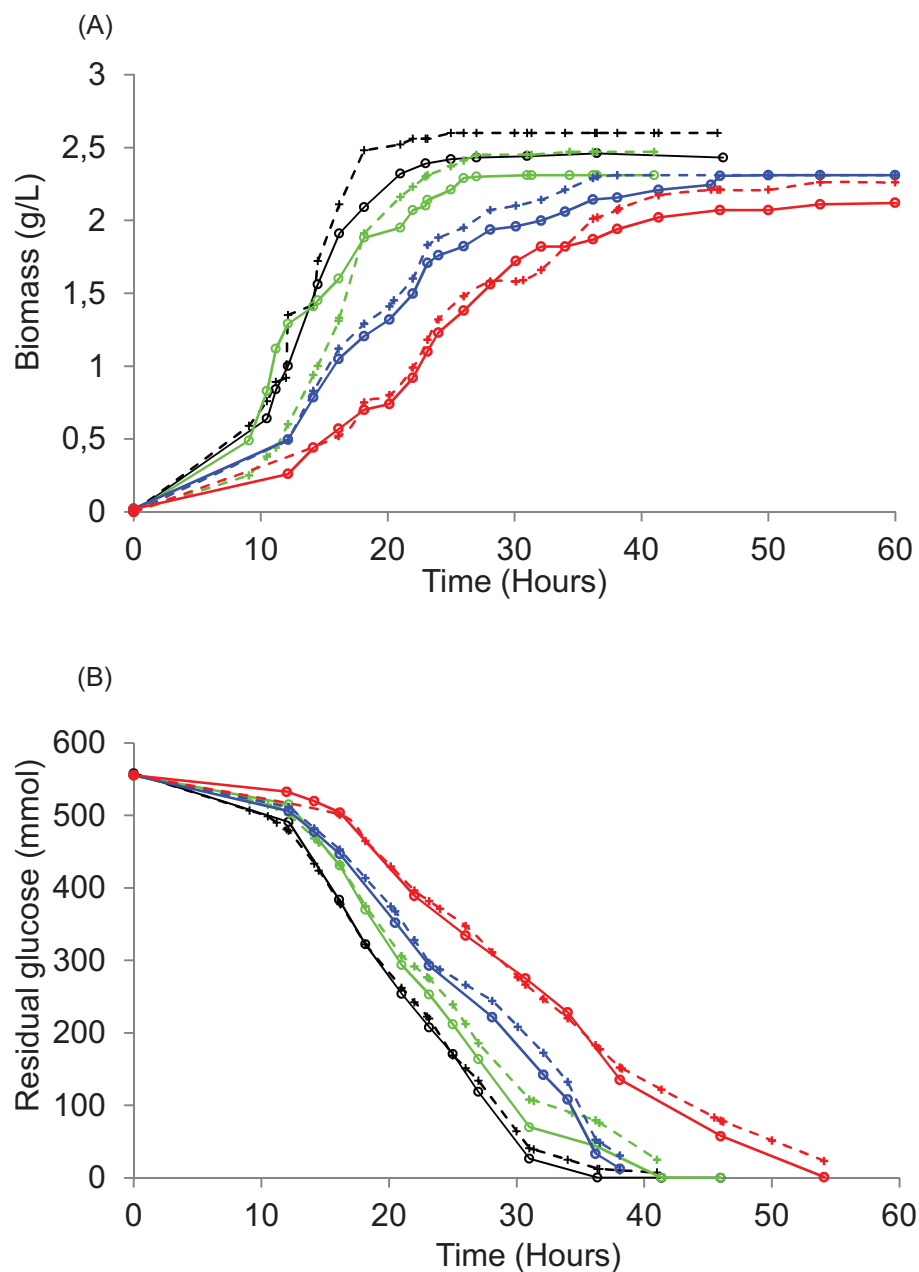
α_i^{NADH} : Stoichiometric coefficient of NADH in reaction i
 $q_i^{\text{byproducts}}$: Amount of reaction i in metabolic pathways involved in by-products synthesis

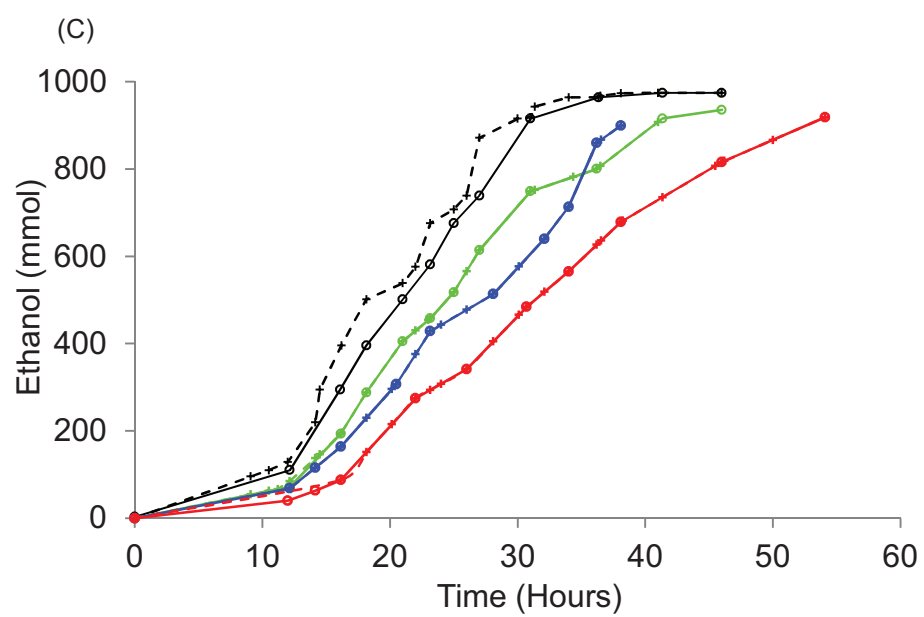
$$\text{NADH byproducts} = 2.46 \text{ mmol/gDW}$$

$$\text{NADH total} = \text{NADH biomass} + \text{NADH byproducts} = 4.8 + 2.46 = 7.3 \text{ mmol/gDW}$$

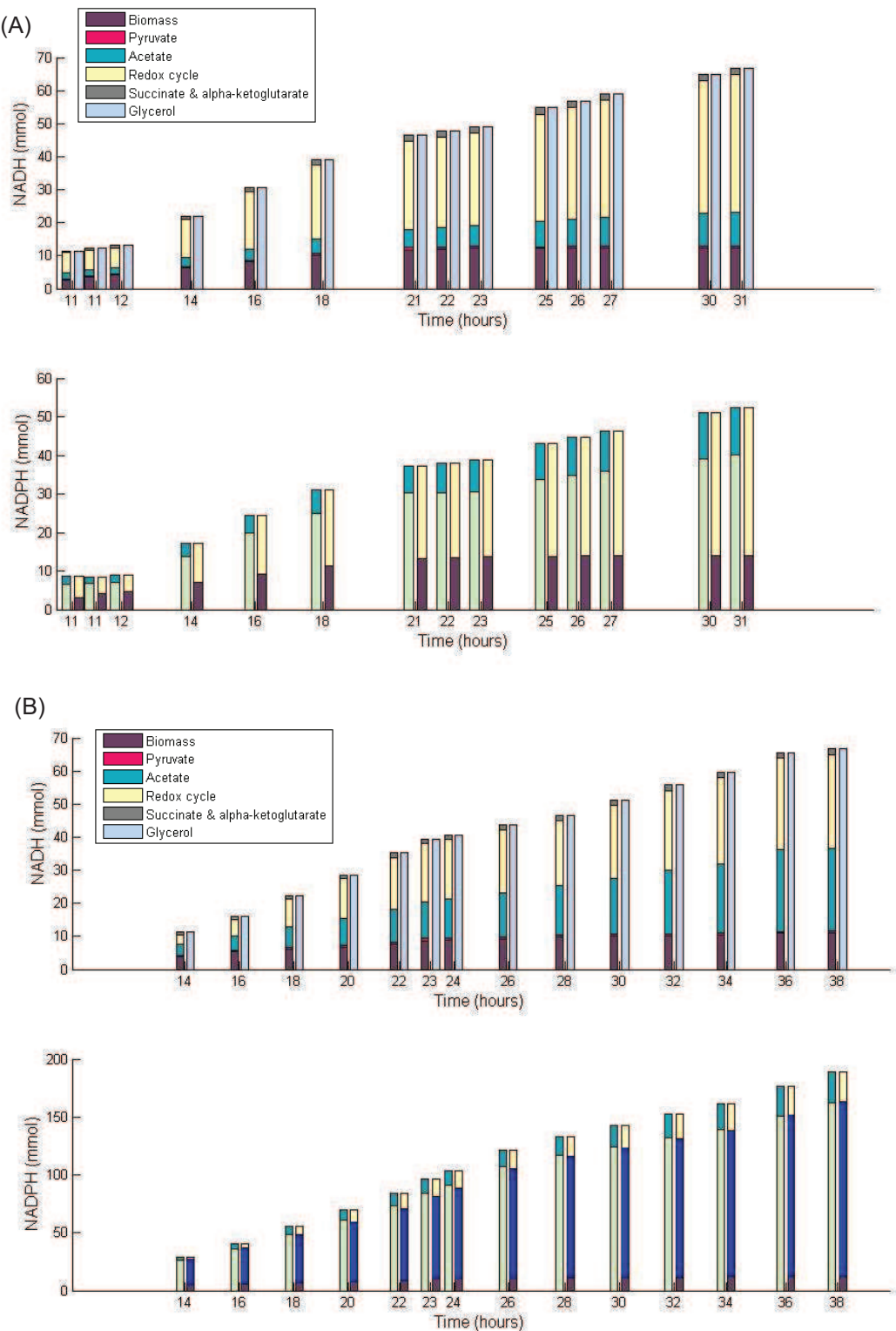
Supplementary file 4 – Quality of *DynamoYeast*'s predictions.

Reconciliation of experimental data (line with circle) and predictions (dash with cross) (from the *DynamoYeast* model. Kinetics of biomass synthesis (A), glucose consumption (B) and ethanol production (C) in response to four levels of NADPH demand (0 (black), 100 (green), 200 (blue) and 300 (red) mM acetoin).



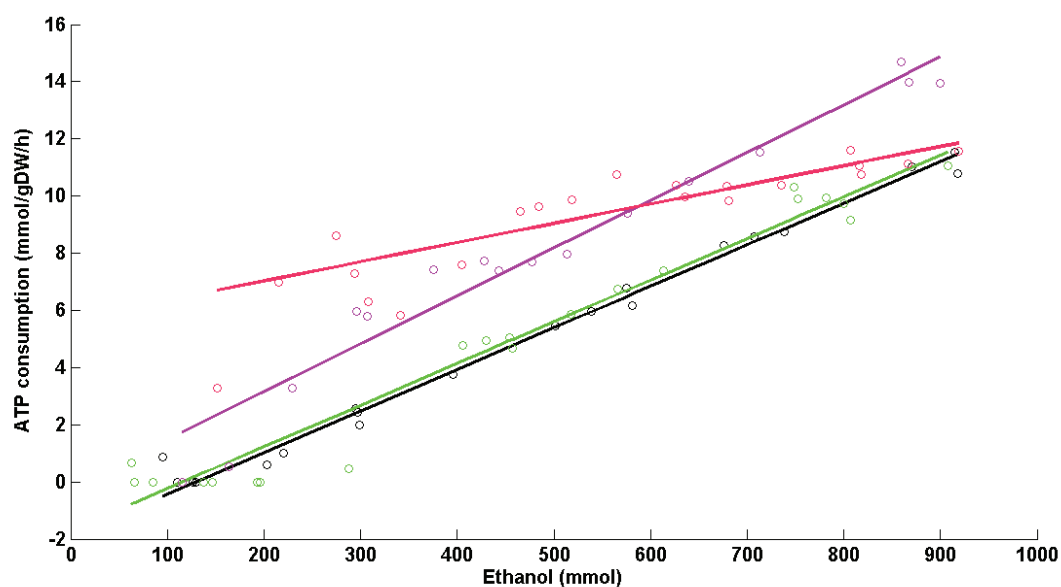


Supplementary file 5 – Redox balance in function of time during the fermentation for the condition without acetoin (A) and 200 mM acetoin (B).



Supplementary file 6– Estimation of ATP consumption flux

The equation used to estimate the ATP consumption flux (mmol per gram of biomass per hour) is detailed in the Materials and Methods section. ATP consumption was calculated for the strain 59A NADPH-Bdh at four levels of NADPH perturbation obtained by addition of 0 (black), 100 mM (green), 200 mM (purple) and 300 (pink) mM acetoin.



Chapitre II : Résultats complémentaires

Effet de l'acétoïne sur les 3 souches : essais préliminaires

La mise au point des conditions expérimentales a nécessité un certain nombre d'essais préliminaires, afin de définir les concentrations d'acétoïne à ajouter dans le milieu. Les premiers essais ont montré la nécessité de prendre des précautions particulières pour manipuler l'acétoïne, du fait de la volatilité importante de ce composé. Ainsi la solution d'acétoïne a été préparée extemporanément et conservée dans la glace jusqu'à ajout dans le milieu de culture. Afin de quantifier précisément la perturbation, nous avons systématiquement mesuré les concentrations d'acétoïne et de 2,3-butanediol dans le milieu de culture, au début et à la fin de fermentation.

Nous avons ensuite testé les effets sur la physiologie et le métabolisme de la levure d'une large gamme de concentrations (20, 50, 75, 100, 150, 170, 200 mM). Du fait de la robustesse de la levure à cette perturbation, nous avons ensuite augmenté la gamme à 300 et 400 mM.

MFA dynamique

Dans le **chapitre II**, nous avons analysé l'effet de la perturbation du NADPH sur la souche NADPH-Bdh, en phase de croissance, à un stade où 90% de la biomasse totale est formée. Cependant pour renforcer notre analyse, nous avons aussi réalisé cette étude tout au long de la fermentation, en utilisant une approche de type MFA dynamique. Selon le principe de l'approche MFA, qui consiste à déterminer les flux intracellulaires en contraignant le réseau métabolique à partir de l'ensemble des métabolites extracellulaires dosés, avons réconcilié les données expérimentales et le réseau stœchiométrique en utilisant l'équation décrite dans le **Matériel et méthodes du Chapitre II** à chaque point d'avancement de la fermentation (14 à 17 points de cinétique par fermentation). Les contraintes dynamiques utilisées sont directement déduites des cinétiques de consommation de glucose et de production des sous-produits fermentaires et de la biomasse de la souche Bdh-NADPH (**Chapitre II, Figure 3**).

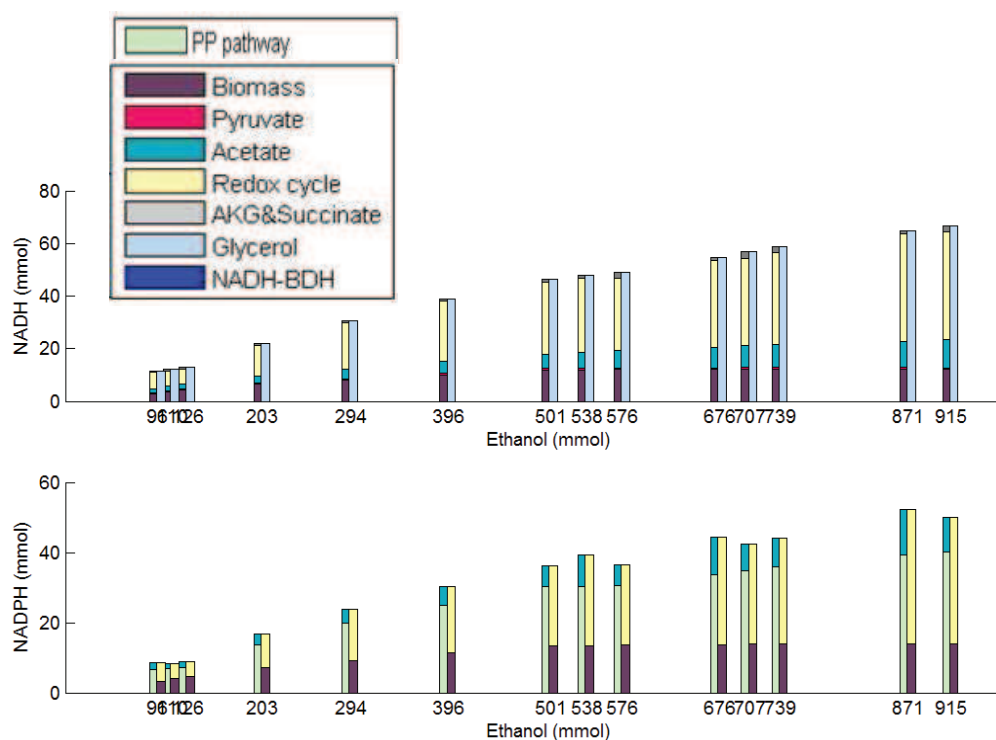


Figure 33 : Quantité de NADH ou de NADPH consommé et produit par la souche Bdh-NADPH sans acétoïne au cours de la fermentation.

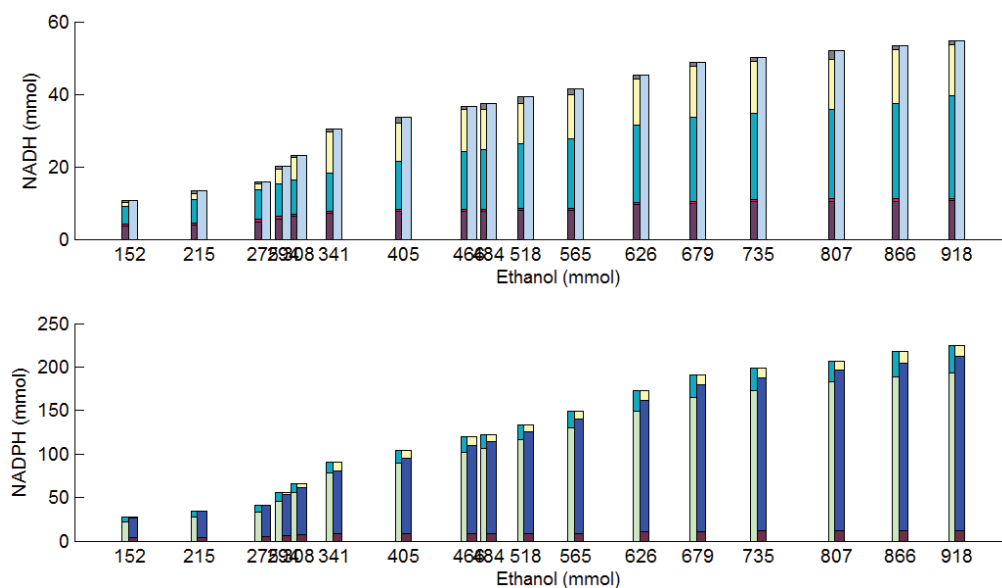


Figure 34 : Quantité de NADH (A) ou de NADPH (B) consommé et produit par la souche Bdh-NADPH en présence de 300 mM d'acétoïne au cours de la fermentation.

Nous avons appliqué cette approche pour la condition de référence (sans acétoïne) et pour chacune des perturbations (100, 200, 300 et 400 mM d'acétoïne). Les **Figures 33 et 34** montrent les résultats obtenus sans acétoïne et en présence de 300 mM d'acétoïne. Ces résultats montrent l'efficacité de la méthode et permettent de généraliser à l'ensemble de la fermentation les conclusions sur la contribution de ces voies analysées à un stade de la fermentation et présentées dans le **chapitre II**.

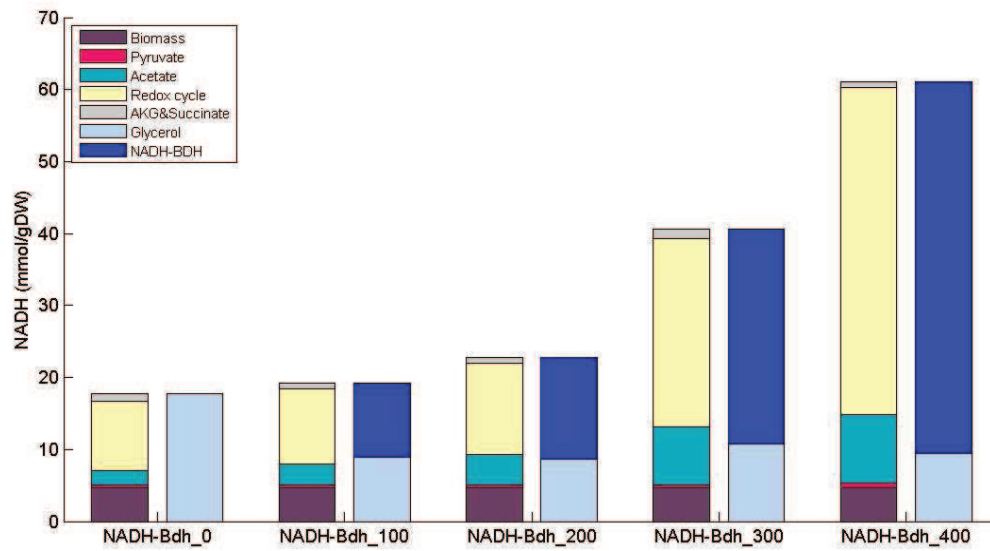
Analyse des contraintes redox dans le cas d'une perturbation NADH

Comme pour la souche Bdh-NADPH et 59A, la quantité de glycérol produite par la souche Bdh-NADH est supérieure à la quantité de glycérol théorique nécessaire à la réoxydation du NADH lié à la production de la biomasse et des sous-produits (**Figure 35A**), suggérant un surplus de NADH cytosolique. Pour équilibrer la balance NADH/NAD^+ , nous avons postulé l'existence d'un cycle redox permettant la conversion de NADPH en NADH (par exemple le cycle acétaldéhyde-glutamate) (**Figure 35A**).

Le premier effet de la perturbation NADH est une diminution du glycérol, cohérente avec la compétition entre la Bdh-NADH et la glycérol 3-P déshydrogénase pour la réoxydation du NADH. Afin d'équilibrer la balance NADH/NAD^+ , l'activité du cycle ACAL/GLU est augmentée, générant du NADH. Pour de fortes perturbations (300 et 400 mM), un niveau basal de 5 mM de glycérol produit est maintenu (**Figure 35A**), probablement du fait de son rôle pour combattre le stress osmotique. La contribution du cycle redox augmente fortement (**Figure 35**), ce qui entraîne une augmentation de la consommation de NADPH (**Figure 35B**). La réponse à cette demande en NADPH se fait en partie par la voie acétate et majoritairement par la VPP. Notons ici que la quantité de NADPH consommée dans la souche Bdh-NADH en présence de 400 mM d'acétoïne équivaut à une perturbation pour la souche Bdh-NADPH se situant entre 100 et 200 mM d'acétoïne (**chapitre II Figure 4A**). Nous sommes donc loin de la zone de saturation de la VPP.

Dans le **chapitre III**, nous analyserons l'effet d'une perturbation NADPH et nous la comparerons avec une perturbation NADH, représentée par la souche Bdh-NADH cultivée en présence de 200 mM acétoïne. Il est intéressant de noter que la quantité de NADH consommée par la souche NADPH-Bdh (200 mM acétoïne) équivaut à la quantité de NADPH consommée par la souche NADH-Bdh (100 mM acétoïne).

(A)



(B)

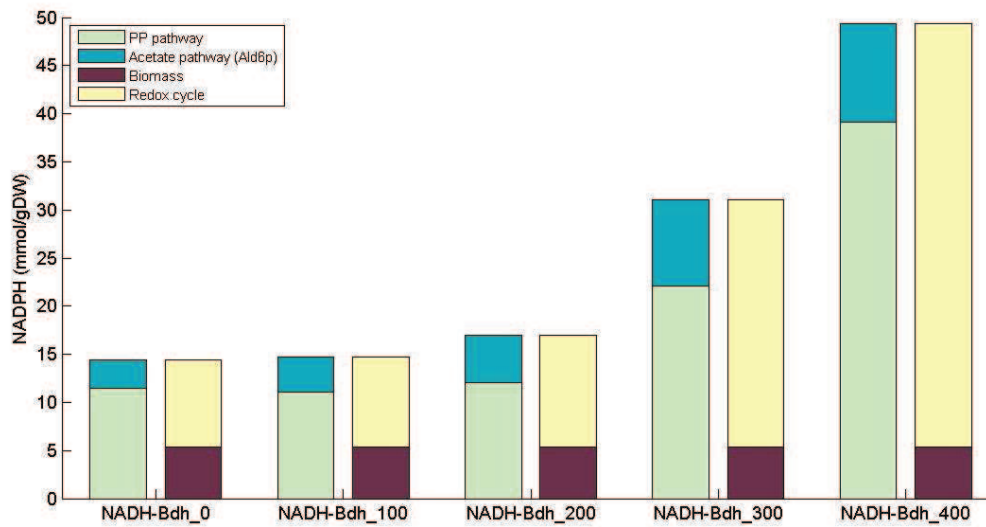


Figure 35 Réponse métabolique de la levure à une augmentation de la demande en NADH. La distribution des flux estimée par DynamoYeast permet de calculer les productions et consommation de NAD(P)H associées à la formation de chaque métabolites.

Quantité de NADH (A) et de NADPH (B) formés (histogramme de gauche) et consommés (histogramme de droite) pour 5 niveaux de perturbation NADH (0,100, 200, 300 and 400 mM d'acétoïne).

Analyse du métabolisme fermentaire de la souche 59A par une approche FBA

Dans le **chapitre II**, nous avons utilisé une approche de MFA afin d'analyser précisément les contraintes redox. Comme cela a été mentionné au **chapitre I**, il est également possible de prédire les flux métaboliques par une approche FBA basée sur une fonction "objectif". Il nous a semblé intéressant de confronter les données acquises sur la souche 59A (sans ajout d'acétoïne) aux prédictions réalisées par les FBA.

Nous avons dans un premier temps confronté les prédictions obtenues par les FBA en maximisant la biomasse aux données expérimentales obtenues avec la souche 59A sans ajout d'acétoïne. Il est à noter que dans cette analyse FBA le cycle redox ACAL/GLU, décrit dans le **chapitre II Figure 6** est actif. La maximisation de la biomasse a conduit systématiquement à des prédictions où la quantité prédite de glycérol est 2 fois plus faible que celle observée expérimentalement. Cette observation signifie que cette souche pourrait théoriquement produire davantage de biomasse, mais qu'elle a adopté une autre stratégie.

Nous avons alors cherché à savoir si son comportement pouvait correspondre à la maximisation de la production d'un sous-produit, en particulier de l'éthanol. De façon remarquable, en choisissant une fonction "objectif" correspondant à la maximisation du flux de production de l'éthanol, nous recouvrons une distribution de flux en accord avec les données expérimentales. De plus, le flux prédit à travers le cycle redox ACAL/GLU équilibre la production de NADH et explique la surproduction du glycérol attachée à la souche 59A. L'étude détaillée du réseau métabolique et des rigidités attachées aux différents cofacteurs indique que la maximisation du flux de production de l'éthanol conduit à maximiser le flux de consommation de l'ATP.

Dans le réseau stœchiométrique que nous avons considéré, nous avons interdit les cycles futiles d'ATP/ADP triviaux (de type Pfk/Fbp). La solution que nous avons obtenue exploite donc au mieux les degrés de liberté disponibles pour maximiser la consommation d'ATP. A cette fin, l'existence de la réaction ACAL/GLU offre une possibilité supplémentaire pour consommer de l'ATP en produisant du glycérol. Cette surproduction de glycérol est possible à travers l'augmentation du flux de la VPP et l'instauration du cycle redox convertissant le surplus de NADPH produit par la VPP en NADH à réoxyder pour produire le glycérol. Ainsi, la maximisation du flux de production de l'éthanol conduit de façon directe à maximiser la consommation instantanée du glucose (pour produire le glycérol

et à travers l'augmentation du flux de la VPP). Ce dernier point peut être interprété dans le contexte fermentaire comme un moyen de minimiser le temps de fermentation total. Notons que ce dernier point fait partie de l'un des critères d'appréciation de sélection des souches œnologiques.

Bien que la consommation d'ATP en condition de fermentation soit un paramètre essentiel pour contraindre le flux glycolytique, il est souvent résumé à un coefficient de maintenance sans prendre en compte la variabilité de ce coefficient entre les souches et les conditions environnementales. Cet aspect pourtant essentiel pour déterminer les flux est peu discuté dans la littérature. Le fait qu'il faille adapter ce coefficient aux conditions étudiées implique aussi qu'il est difficile sans plus d'information, de prédire la réelle valeur du flux glycolytique sans une adaptation préalable de ce coefficient.

Nous avons montré dans le **chapitre II additional file 4** que cette demande croît de façon linéaire en fonction de la concentration de l'éthanol présent dans le milieu. En effet, il est connu depuis longtemps que l'augmentation de la concentration de l'éthanol a un effet significatif sur l'augmentation du flux d'entrée de H^+ dans le cytoplasme.

Récemment, Vargas, et al. (2011) ont pris en compte ce phénomène en culture batch et fermentaire, en calibrant de façon ad hoc et pour chaque point de fermentation, la consommation instantanée d'ATP de maintenance pour qu'elle soit cohérente avec les données expérimentales de biomasse, de production d'éthanol, de glycérol, et d'acétate et de consommation de glucose. En d'autres termes, un coefficient de maintenance de l'ATP dépendant de l'état d'avancement de la fermentation a été appliqué. Cependant, cette approche permet de réconcilier les données et le réseau mais ne permet pas de calculer la valeur de l'ATP.

Croissance du mutant *gdh2Δ*

Afin de tester l'hypothèse du cycle redox ACAL/GLU, les souches 59A et 59A Bdh-NADPH ont été délétées pour le gène *GDH2*. Sur glucose, la délétion n'affecte pas le taux de croissance ni la production de glycérol, ce qui suggère que le cycle ACAL/GLU n'est pas le cycle qui permet de produire l'excès de NADH dans la souche 59A.

**CHAPITRE III : ANALYSE
COMPARATIVE TRANSCRIPTOMIQUE,
METABOLOMIQUE ET FLUXOMIQUE
DE LA REPONSE DE *SACCHAROMYCES
CEREVISIAE* A UNE AUGMENTATION
DE L'OXYDATION DU NADPH**

Chapitre III : Analyse comparative transcriptomique, métabolomique et fluxomique de la réponse de *Saccharomyces cerevisiae* à une augmentation de l'oxydation du NADPH

L'approche de l'analyse des flux par le modèle *DynamoYeast* a permis de révéler que la levure est capable de réorienter ses flux pour répondre à différents niveaux de demande de NADPH et a développé une autre stratégie afin de répondre à un fort niveau.

Les travaux présentés dans ce chapitre avaient pour objectifs (i) d'analyser expérimentalement quelles sont les voies les plus modulées pour générer le NADPH et (ii) d'identifier la part du contrôle transcriptionnel et métabolique dans l'ajustement des flux.

Dans un premier temps, notre but était de vérifier expérimentalement l'augmentation de la contribution de la VPP, principale voie de formation du NADPH, et d'identifier si d'autres nœuds métaboliques étaient modifiés lors d'une augmentation de la demande de NADPH. Pour étudier expérimentalement la distribution des flux intracellulaires et quantifier l'intégration de la réponse du réseau métabolique, nous avons utilisé l'approche de ^{13}C -MFA qui est l'approche la plus courante.

En accord, avec la méthode d'analyse des flux *in silico*, les flux sont modulés pour répondre aux différents niveaux de demande en NADPH et en particulier ceux de la VPP.

Dans ce chapitre, nous décrivons les étapes qui ont permis d'analyser les différents niveaux de contrôles mises en place lors d'un besoin croissant en NADPH :

(i) par une analyse transcriptomique comparative de la souche Bdh-NADPH pour 3 niveaux de perturbations (100, 200 et 300 mM d'acétoïne) et de la souche de référence 59A sans perturbation, nous avons analysé la part du contrôle transcriptionnel dans l'ajustement des flux.

(ii) par un dosage des métabolites intracellulaires par IE/MS/MS couplé avec les connaissances des flux intracellulaires que nous avons obtenu, nous avons pu dégager la part du contrôle métabolique dans la réorientation des flux.

La combinaison de ces données globales nous a permis d'analyser les régulations génétiques qui contrôlent directement ou indirectement le NADPH et de mettre en évidence

expérimentalement la mise en place d'une autre source de NADPH au dépend d'une consommation d'énergie pour répondre à une très forte demande de NADPH.

Nous avons focalisé l'étude, jusqu'à maintenant, sur les modifications du métabolisme primaire. Cependant, en fermentation, la levure produit également d'autres composés secondaires et peu d'informations ont été rapportées jusqu'à ce jour concernant les conséquences de la modification de l'équilibre redox sur la formation de ces métabolites. Nous avons déterminé la concentration des composés volatiles par CPG pour différents niveaux de NADPH. Ceci nous a permis de détecter un effet d'une perturbation NADPH sur le métabolisme secondaire et d'identifier les modifications des nœuds métaboliques ou de certains métabolites du MCC à l'origine de ces variations.

A comparative transcriptomic, fluxomic and metabolomic analysis of the response of *Saccharomyces cerevisiae* to increases in NADPH oxidation

Magalie Celton^{1,2}, Isabelle Sanchez¹, Anne Goelzer², Vincent Fromion², Carole Camarasa¹ and Sylvie Dequin^{1§}

¹ INRA, UMR1083, F-34060 Montpellier, France

² INRA, MIG, F-78350 Jouy-en-Josas, France

§Corresponding author: dequin@supagro.inra.fr

INRA, UMR1083 SPO, 2 place Viala, F-34060 Montpellier, France

Phone: +33 (0)4 9961 2528

E-mail addresses:

MC: celton@supagro.inra.fr

AG: anne.goelzer@jouy.inra.fr

CC: camarasa@supagro.inra.fr

VF: vincent.fromion@jouy.inra.fr

SD: dequin@supagro.inra.fr

Abstract

Background

Redox homeostasis is essential to sustain metabolism and growth. We recently reported that yeast cells meet a gradual increase in imposed NADPH demand by progressively increasing flux through the pentose phosphate (PP) and acetate pathways and by exchanging NADH for NADPH in the cytosol, via a transhydrogenase-like cycle. Here, we studied the mechanisms underlying this metabolic response, through a combination of gene expression profiling and analyses of extracellular and intracellular metabolites and ^{13}C -flux.

Results

NADPH oxidation was increased by reducing acetoin to 2,3-butanediol in a strain overexpressing an engineered NADPH-dependent butanediol dehydrogenase cultured in the presence of acetoin. An increase in NADPH demand to 22 times the anabolic requirement for NADPH was accompanied by the intracellular accumulation of PP pathway metabolites consistent with an increase in flux through this pathway. Increases in NADPH demand were accompanied by the successive induction of several genes of the PP pathway. NADPH-consuming pathways, such as amino-acid biosynthesis, were upregulated as an indirect effect of the decrease in NADPH availability. Metabolomic analysis showed that the most extreme modification of NADPH demand resulted in an energetic problem. Our results also highlight the influence of redox status on aroma production.

Conclusions

Combined analyses of ^{13}C -flux, intracellular metabolite levels and microarrays revealed that NADPH homeostasis, in response to a progressive increase in NADPH demand, was achieved by the regulation, at several levels, of the PP pathway. This pathway is principally under metabolic control, but regulation of the transcription of PP pathway genes can exert a stronger effect, by redirecting larger amounts of carbon to this pathway to satisfy the demand for NADPH. No coordinated response of genes involved in NADPH metabolism was observed, suggesting that yeast has no system for sensing NADPH/NADP⁺ ratio. Instead, the induction of NADPH-consuming amino-acid pathways in conditions of NADPH limitation may indirectly trigger the transcription of a set of PP pathway genes.

Background

Redox homeostasis is a fundamental requirement for the maintenance of metabolism. Intracellular redox potential is determined principally by the ratio of NADH/NAD^+ and $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ cofactors, which are involved in about 200 reactions in *Saccharomyces cerevisiae* [1]. These metabolites are interconnected by many different pathways. Any change to intracellular redox balance therefore has far-reaching effects on the metabolic network. Redox engineering strategies thus often have wide-ranging effects on metabolism [2-4]. A better understanding of the way in which yeast efficiently adjusts its metabolic fluxes in response to genetic or environmental redox changes is therefore essential for the prediction and control of these effects.

We recently investigated the response to increases in NADPH oxidation, in an original biological system in which NADPH demand can be specifically and gradually modified [5]. This system involves the culture of a strain overexpressing an engineered NADPH-dependent Bdh1p enzyme in the presence of acetoin (Figure 1). We analyzed the effect of four levels of NADPH demand (obtained by adding 0 to 300 mM acetoin to the medium) on intracellular flux, through the use of a constraint-based approach based on a dedicated stoichiometric model of *S. cerevisiae* during fermentation. The pentose phosphate pathway (PP pathway) and the acetate synthesis pathway (*via* the action of the NADP^+ -dependent acetaldehyde dehydrogenase Ald6p) satisfied 80 and 20%, respectively, of the NADPH demand when this demand was increased to up to 22 times the anabolic requirement. If demand was increased still further, the PP pathway was saturated and our model predicted a role for the glycerol-DHA cycle, which exchanges NADP^+ and NADH for NAD^+ and NADPH, at the

expense of one ATP molecule (Figure 1).

Despite these significant advances in our understanding of NADPH metabolism, little is known about the mechanisms regulating NADPH homeostasis. It is generally thought that the pentose phosphate pathway is controlled principally at the enzymatic level, with NADPH and ATP competitively inhibiting both the glucose-6 phosphate dehydrogenase Zwf1p and the 6-phosphogluconate dehydrogenase Gnd1p [6]. The coordinated regulation of genes involved in NADPH metabolism, including most of PP pathway genes, has been reported in conditions of oxidative stress. The activation of NADPH-dependent genes involves Stb5p, a zinc-binding factor [7], which also represses the expression of *PGII*, encoding the phosphoglucose isomerase at the junction between glycolysis and the PP pathway. This transcription factor plays a key role in rerouting carbon flux to provide the additional NADPH required for the response to oxidative stress, as demonstrated by the greater susceptibility of the *stb5Δ* mutant to several chemicals and oxidants [7, 8] and by the greater resistance to diamide of a strain overexpressing *STB5* [9]. Stb5p was also recently shown to be essential for acetaldehyde tolerance [10] and, under anaerobic conditions, to play a major role the maintenance of basal flux through the PP pathway [11].

High-throughput experiments and metabolic modeling are powerful approaches for studying the global response of cells to environmental changes and identifying the regulatory mechanisms involved in the rerouting of the metabolic network. We analyzed the transcriptome, extracellular and intracellular metabolites and ^{13}C flux, to identify the regulatory mechanisms involved in the response of yeast cells to various increases in NADPH

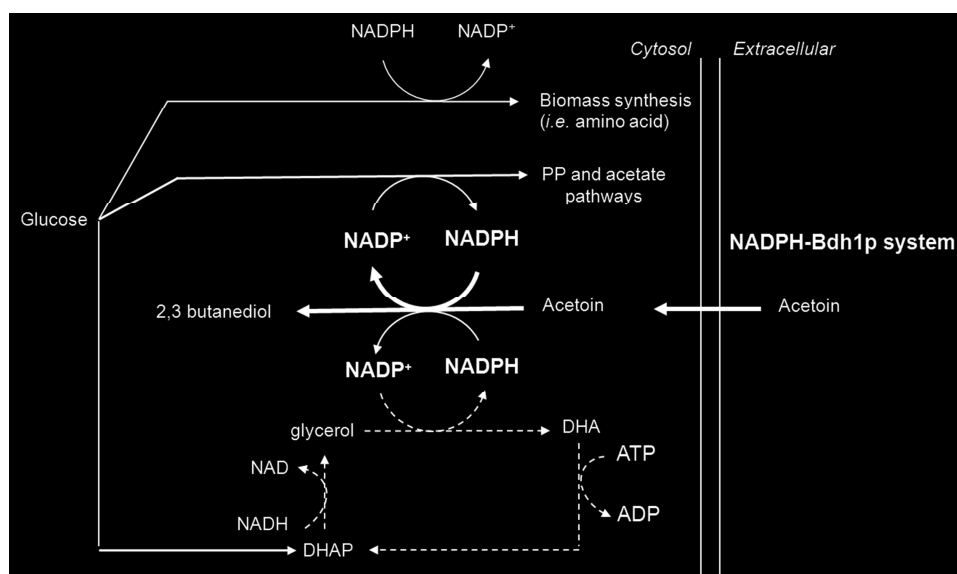


Figure 1 - Schematic diagram of the mechanisms involved in the response to increases in NADPH demand Increases in NADPH demand were imposed by adding acetoin to the growth medium of a strain overexpressing an engineered NADPH-dependent butanediol dehydrogenase (NADPH-Bdh1p). The glycerol-DHA cycle (dashed line) acts as a transhydrogenase system, supplying additional NADPH in response to high NADPH demand (Celton *et al.*, in press). DHA: dihydroxyacetone; DHAP: dihydroxyacetone phosphate.

oxidation. We found that redox homeostasis was maintained principally through metabolic control, with regulation of the transcription of certain genes of the PP pathway occurring at higher levels of NADPH demand. We also observed a general increase in the expression of genes involved in amino-acid synthesis, particularly those involved in the synthesis of sulfur-containing amino acids, as an indirect response to the lower availability of NADPH.

Results

Transcriptomic response to changes in NADPH and NADH concentrations

We investigated the contribution of genetic control to the response to an increase in NADPH oxidation, by carrying out a microarray analysis of NADPH-Bdh cells with various levels of NADPH availability, achieved by adding 100, 200 or 300 mM acetoin to the growth medium. These conditions increase NADPH demand by factors of 8, 13 and 22, respectively, with respect to the anabolic demand [5]. We cultured the NADH-Bdh strain in the

presence of 200 mM acetoin, both as a control and to assess the specificity of the effect on NADPH demand. Transcriptome analysis was performed with RNA samples extracted from cells harvested at mid-exponential growth phase (Figure 2A). At this time point, strains exposed to different degrees of change in NADPH demand differed in their acetate (a marker of NADPH metabolism) production (Figure 2B) [5].

We carried out multitest with a modified *t*-test, using a false-discovery rate of 5×10^{-2} and a threshold of a 1.5-fold change to identify genes displaying significant differences in mRNA levels between conditions in which NADPH demand was modified and control (strain 59A without acetoin) conditions (Additional file 1). The number of genes displaying differential expression clearly increased with the degree to which NADPH demand was modified (Figure 3). In the presence of 100 mM acetoin, only eight genes displayed a change in expression level, whereas 71

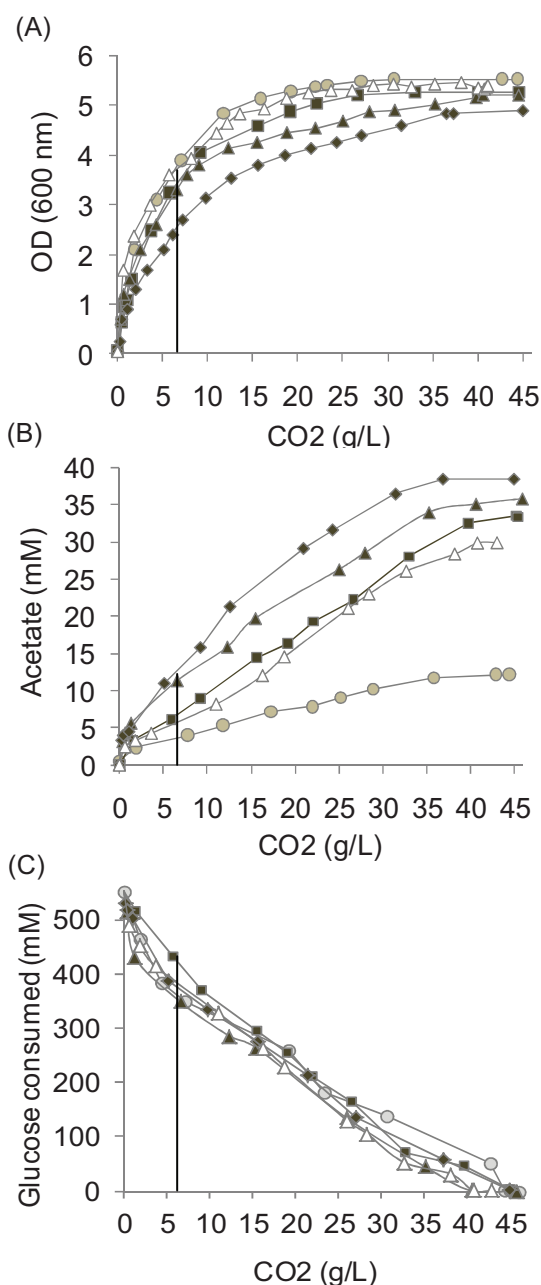


Figure 2 - Growth (A), acetate production (B) and glucose consumption (C) profiles during batch fermentation (2x SD, 10 % glucose). The strains were grown in the presence of 100 (square), 200 (triangle) and 300 (diamond) mM acetoin (NADPH-Bdhp), 200 mM acetoin (NADH-Bdhp, open triangle) and without acetoin (59A, circle).

genes were upregulated and 37 were downregulated in the presence of 200 mM acetoin and 61 genes were upregulated and 48 were downregulated in the presence of 300 mM acetoin. Changes in NADH demand had little overall effect on gene expression, as only 23 genes were differentially regulated. This suggests that

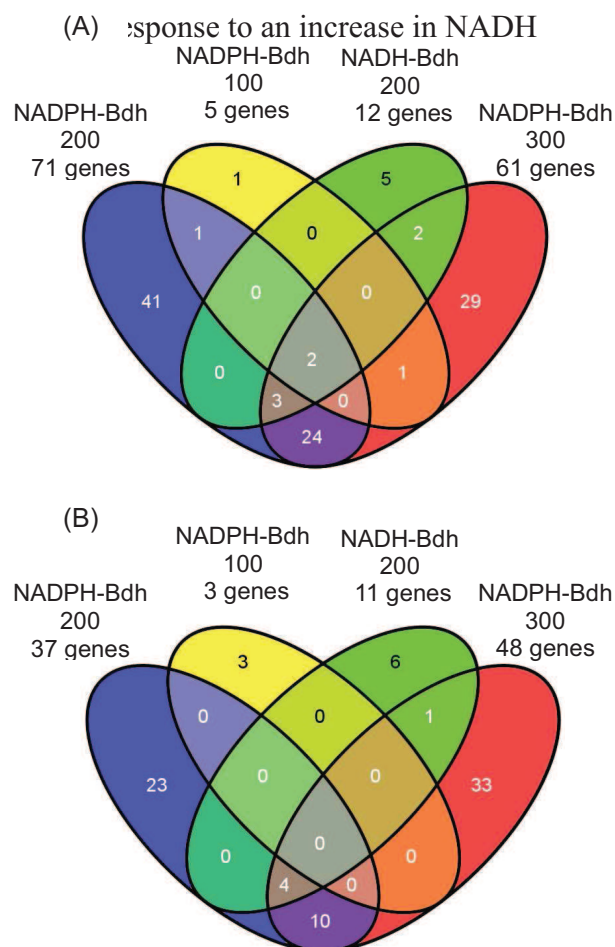


Figure 3 - Venn diagrams. Upregulated (A) and downregulated (B) genes in the three NADPH demand conditions and following an increase in NADH oxidation.

demand to four times (at 200 mM acetoin) or in NADPH to eight times (at 100 mM acetoin) the amount required for anabolism [5] mostly involved metabolic control.

We began our study of the transcriptional response to NADPH, by carrying out a biological process gene-ontology search to characterize the NADPH response and to identify the processes involved at various levels of NADPH demand. A comparison of the gene transcript profiles of cells subjected to the modification of NADPH demand (Table 1) showed that many of the genes upregulated were involved in amino-acid biosynthesis and sulfate assimilation pathways. In particular, genes involved in

	NADH-Bdh 200 mM	NADPH-Bdh 100 mM	NADPH-Bdh 200 mM	NADPH-Bdh 300 mM
f				
Up-regulated genes				
10		alcoholic metabolic bioprocess GO:0006066		
	BDH1 ADH7	BDH1	BDH1 ADH7	BDH1 ADH7
196		response to stress GO:0006950		
		PAU24 PAU14 PAU1	PAU7 PAU24 PAU3 PAU10 PAU2 PAU11 PAU12 PAU13 PAU14 PAU15 PAU1 PAU17 PAU18 PAU23 PAU4 PAU6 MET22 PAU20 FRT1	PAU7 PAU2 PAU14 PAU17 PAU4 MET22 ZEO1 PAU20
511		translation GO:0006412		
		RPL31A RPS16B RPS17B RPL27B RPL23B RPL30 RPL24A RPL24B RPL40B RLP24 RPS31 RPS25B RPS22B RPS17A RPL15B RPL9B RPS3 RPS19A RPL25 RPS28A RPL20B RPL33A		
41		methionine biosynthetic process GO:0009086		
	MET10 MET17	MET6 MET3 MET14 MET17 MET22 MET16		MET6 MET10 MET5 MET14 MET17 MET22 MET16
10		L-serine biosynthetic process GO:0006564		
		SER3		SER3 SER33
12		lysine biosynthetic process GO:0009085		
		LYS12 LYS9		LYS12 LYS9
		hydrogen sulfide biosynthetic process GO:0070814		
				CYS4
561		oxidation reduction GO:0055114		
	BDH1 ADH7 MET10 ARI1 ERG3 AHP1 AAD15			BDH1 ADH7 AAD3 YDR541C SER3 MET10 ARI1 GND1 SER33 LYS12 MET5 MDH1 LYS9 AAD15 IDH2 MET16
10		pentose-phosphate shunt GO:0006098		
		SOL3 GND1		SOL3 GND1 TAL1 TKL1
19		cofactor metabolic process GO:0051186		
				MDH1 IDH2
9		glucose catabolic process to ethanol GO:0019655		
	PDC5			
Down-regulated genes				
8		fermentation GO:0006113		
	ADH4	ADH4		ADH4
129		vacuolar protein catabolic process GO:0007039		
				PEX29 HXK1 STF2 TFS1
9		glucose catabolic process to ethanol GO:0019655		
				PDC1 PDC5
322		translational elongation GO:0006414		
		ZRT1 PRY1 TPO1 AGA1 WHI5 PDR12 SAM3		THI2 ZRT1 QDR2 PRY1 IZH2 WHI5 PDR12 SAM3
103		carbohydrate metabolic process GO:0005975		
				EMI2 HXK1 PGM2 GPH1

Table 1 - Funspec classification into biological process categories of genes up- or downregulated in response to changes in the oxidation of NADPH and NADH. f total number of genes in a given category.

the synthesis of methionine, cysteine, serine and lysine were overexpressed, whereas the expression of only two of these genes (*MET10*, *MET17*) was modified by NADH oxidation. The upregulated genes were significantly enriched in stress-responsive genes from the seripauperin family and genes encoding ribosomal proteins. For the ribosomal protein genes at least, this may be due to differences in the phase of protein synthesis and nitrogen use, as transcriptome analysis was carried out at similar levels of CO₂ production, but not

necessarily at the same physiological stage for protein synthesis. In conditions in which NADPH demand was strongly modified, several NAD(P)H-dependent oxidoreductases were upregulated (see below).

The repressed genes included *ADH4*, which encodes an NADH-dependent alcohol dehydrogenase. This gene displayed the highest level of repression, by a factor of 5 at an acetoin concentration of 200 mM and a factor of 10 at an acetoin concentration of 300 mM. *ADH4* was also

downregulated (by a factor of 3.7) in response to the modulation of NADH levels.

These results suggest that the product of the *ADH4* gene is involved in redox homeostasis. Adh4p is generally thought to make use of NAD⁺, but the role, distribution within the cell and cofactor specificity of this enzyme remain unclear [12].

At an acetoin concentration of 300 mM, several genes involved in carbohydrate metabolism and alcoholic fermentation, such as *PGM2*, *EMI2*, *GPH1*, *HXK1*, *PDC1* and *PDC5*, were repressed. *PGM2* is involved in the production of UDP-glucose, a precursor of trehalose and trehalose-6-phosphate (T6P) [13], whereas *GPH1* and, probably, *EMI2* are involved in glycogen catabolism. The repression of genes involved in the synthesis of reserve carbohydrates might optimize NADPH synthesis by rerouting carbons towards the PP pathway. The same may also be true for the repression of genes involved in glycolysis and alcoholic fermentation. However, as pyruvate decarboxylase is also used to generate acetoin from acetaldehyde, the downregulation of *PDC1* and *PDC5* may result from disturbance of the acetaldehyde node. By contrast, *PDC5* was upregulated in conditions in which NADH levels were modified. In such conditions, this regulation may have resulted from the accumulation of acetaldehyde (Table 3), as previous studies have shown that the induction of another *PDC* gene (*PDC1*) was correlated with high levels of acetaldehyde production [14].

Pathways involved in NADPH synthesis

In our previous model-based data reconciliation analysis of the response to NADPH demand modulation, we showed that yeast cells responded to increases in NADPH demand by increasing flux through the PP and acetate pathways, which covered 80% and 20% of the NADPH demand, respectively. No effect

on the expression of genes involved in acetate production (*ALD* genes) or the PDH-by pass was observed, other than the repression of *PDC* genes. By contrast, several genes of the PP pathway were upregulated in response to increasing NADPH demand (Figure 4). *GND1* and *SOL3* were induced when a moderate increase in NADPH demand was imposed (200 and 300 mM acetoin). In the conditions in which NADPH demand was highest (300 mM acetoin), two genes of the non-oxidative part of the PP pathway, *TKL1* and *TAL1*, were also upregulated.

NADP(H)-consuming pathways

One major response to increasing demand for NADPH was the activation of many genes of the sulfate assimilation pathway, which mediates the conversion of SO₄²⁻ to methionine, *S*-adenosylmethionine (SAM) and cysteine (Figure 5). This response was progressive, with the number of genes displaying changes in expression and the intensity of induction increasing with increasing NADPH demand. The entire sulfate assimilation pathway was overexpressed in the presence of 300 mM acetoin. *MET* gene expression is normally activated by the Met4p transcription factor

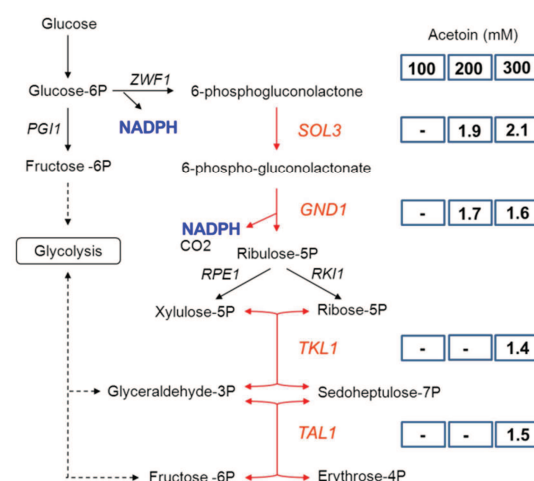


Figure 4 - Transcriptomic response of PP pathway genes to increases in NADPH demand
Induction levels (fold-changes) are indicated in boxes for 100 (left), 200 (center) and 300 (right) mM acetoin. Upregulated genes are shown in red.

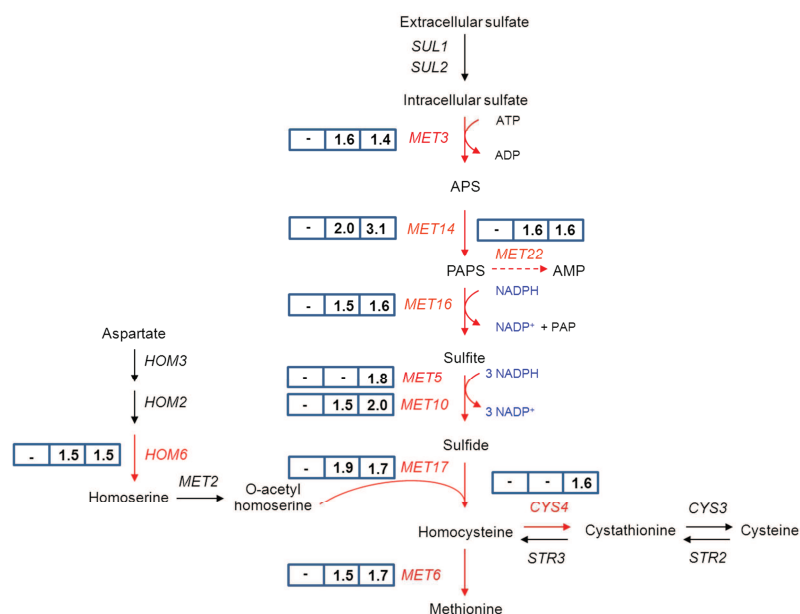


Figure 5. Transcriptomic response of genes of the sulphur assimilation pathway in various conditions of NADPH perturbation. Induction levels (fold-change) are indicated in boxes for 100 (left), 200 (center) and 300 (right) mM acetoin. Up-regulated genes are in red.

when the levels of these sulfur-containing compounds are low [15, 16]. Sulfate assimilation requires considerable amounts of NADPH (7 moles of NADPH are oxidized to NADP^+ to generate 1 mole of methionine from 1 mole of SO_4^{2-}).

Our results therefore suggest that decreases in NADPH availability limit the flux through this pathway, resulting in low levels of sulfur-containing compound production and a global derepression of the sulfate assimilation pathway. These findings are consistent with the coordinated regulation of this pathway, which is controlled principally through feedback repression exerted primarily by cysteine [17].

The upregulation of the *LYS12*, *LYS9* and *LYS2* genes suggests that the same mechanism may operate when lysine production decreases (Table 1, Additional file 1). Two genes encoding the first enzyme of the serine synthesis pathway, *SER3* and *SER33*, were also upregulated (Table 1, Additional file 1), despite the description of this pathway as NADH-dependent [18]. However, as the

biosynthetic reactions involving 3-phosphoglycerate, including those contributing to serine synthesis, constitute a highly branched network connecting the purine, thiamine, histidine and methionine biosynthesis pathways, the upregulation of these genes may be an indirect consequence of a decrease in the intracellular concentration of cysteine.

Several of the downregulated genes are linked to the sulfate assimilation pathway: *SAM3*, which encodes a permease required for SAM utilization, and *TPO1*, which encodes an H^+ transporter involved in exporting the spermidine produced from SAM. Another gene, *QDR2* encodes a multidrug transporter activated in response to the limitation of amino-acid synthesis [19]. The repression of these genes may reflect a need for the cells to conserve methionine, as the synthesis of this compound is probably compromised by the lower availability of NADPH.

Genes encoding several other oxidoreductases, such as *ADH7*, *ARI1*, *GND1*, *YDR541C* (in the presence of 200

mM acetoin), *MDH1*, *IDH2* and *AAD15* (in the presence of 300 mM acetoin) were also upregulated in response to changes in NADPH demand. *ADH7* showed the highest level of variation among these genes. It was overexpressed by a factor 8 in the presence of 200 mM acetoin and by a factor of up to 14 in the presence of 300 mM acetoin. *ADH7* encodes an NAD(P)H-dependent, medium-chain length alcohol dehydrogenase with broad substrate specificity. This enzyme belongs to the cinnamyl family of alcohol dehydrogenases and is thought to be involved in the accumulation of fusel alcohols and in lignin degradation [20]. Adh7p plays a major role in the detoxification of furfural, the overexpression of *ADH7* resulting in a substantial increase in the resistance of cells to high furfural concentration [21]. Our results support these findings, which suggest that Adh7p is involved in the maintenance of redox homeostasis.

ARI1 also gave interesting results. It was strongly induced (by a factor of four) in the presence of 200 and 300 mM acetoin. Arilp is an intermediate-subclass short-chain dehydrogenase/reductase that can use aromatic and aliphatic aldehyde as substrates [22, 23] and was recently shown to contribute to the detoxification of furfural [23, 24].

Surprisingly, despite the dependence of the corresponding enzymes on NADPH, *ADH7* and *ARI1* were also induced when NADH levels were modified, albeit to a lesser extent (by a factor of four for both genes). One possible reason for this is that the changes in NADH levels also affected NADPH/NADP⁺ balance. Indeed, we previously showed that a cycle exchanging NADPH for NADH operated in strain NADH-Bdh and that the activity of this cycle was increased by NADH oxidation, with the overall effect of decreasing NADPH availability [5]. This would account for the induction of *ADH7* and

ARI1 by changes in NADH levels.

Rerouting metabolic flux in response to increases in NADPH demand

Fluxomics and metabolomics are powerful methods for the quantitative analysis of cell metabolism. We used ¹³C-flux to estimate the distribution of intracellular carbon flux in the 59A and NADPH-Bdh strains cultured in the same conditions as for the transcriptomic analysis, but in smaller volumes (10 ml). The most striking change in the metabolic network was a gradual increase in the flux through the PP pathway with increasing NADPH demand, by factors of 1.6 in the presence of 100 mM acetoin, 2.4 in the presence of 200 mM acetoin and 2.9 in the presence of 300 mM acetoin (Table 2). We also observed a decrease in fluxes toward biomass and in fluxes toward anabolic precursors, such as cytosolic and mitochondrial pyruvate, acetyl-CoA, oxaloacetate and α -ketoglutarate, consistent with the lower growth rates in conditions of low NADPH availability (200 and 300 mM acetoin; Figure 2A). Consequently, the PP pathway made a greater contribution to the formation of fructose 6-phosphate (F6P) and glyceraldehyde 3-phosphate (G3P) (Table 2).

Other changes in flux partitioning were observed at the pyruvate and acetaldehyde nodes. At these junctions, carbons were rerouted toward the formation of acetaldehyde and acetate, whereas flux through acetyl-CoA synthase decreased. These findings are consistent with an increase in the contribution of NADPH acetaldehyde dehydrogenase (Ald6p) to the provision of cytosolic NADPH (Table 2) and with the increase in acetate production observed (Figure 2B). Relative fluxes through the anaplerotic and transport reactions (oxaloacetate and pyruvate transport) in the mitochondria tended to decrease. This decrease may be accounted for by the smaller requirement for mitochondrial anabolic precursors.

Metabolic pathways	Acetoin (mM)	0	100	200	300
G6P node					
Phosphoglucosomerase		84.74	78.79	69.95	65.19
PPP		11.40	18.00	27.70	33.00
Carbohydrates synthesis (biomass)		3.33	3.37	2.65	2.10
PYR node					
Pyruvate decarboxylase		164.30	164.80	167.10	167.90
Pyruvate carboxylase		4.20	2.70	2.10	2.50
Import of pyruvate into the mitochondria		0.41	0.88	1.07	0.32
Amino acids synthesis (biomass)		0.29	0.17	0.15	0.09
ACAL node					
Acetaldehyde dehydrogenase		2.40	3.80	4.20	5.60
Alcohol dehydrogenase		161.90	161.00	162.90	162.30
Lipids synthesis (biomass)		0.38	0.27	0.16	0.17
TCA cycle					
Malic enzyme		2.31	1.17	0.78	1.35
Isocitrate dehydrogenase		0.92	0.67	0.74	0.70
Acetyl-CoA node					
Acetyl-CoA synthetase		0.30	0.20	0.22	0.13
Import of acetyl-CoA into mitochondria		0.29	0.17	0.15	0.09
Fructose 6-phosphate from PP pathway		5.65	8.98	12.21	18.57
Import of oxaloacetate into the mitochondria		3.40	2.00	1.60	2.00
Extracellular metabolites production					
Glycerol production		17.80	17.90	14.70	13.70
Acetate production		2.10	3.60	4.00	5.50
Succinate production		0.30	0.26	0.26	0.28

Table 2 - Flux distributions as a function of NADPH demand. All fluxes are normalized with respect to the uptake of 100 mmol glucose.

Other NADPH-generating reactions, such as those catalyzed by malic enzyme and isocitrate dehydrogenase, did not contribute to redox homeostasis in these conditions, and a lower flux through malic enzyme was even observed, probably reflecting the decrease in requirements for anabolism.

Effects of an increase in NADPH oxidation on intracellular metabolites

We obtained a complementary view of metabolic regulation established in response to changes in NADPH demand, by determining the concentrations of 36 intracellular metabolites of the central carbon pathway by IE-MS/MS, in the NADPH-Bdh strain cultured in the presence of 100, 200 and 300 mM acetoin, under the same conditions as for the transcriptomic analysis. We focused on the amounts of intracellular intermediates of

the PP and glycolysis pathways (Figure 6). The metabolite pools were clearly of similar quantities in the presence of 100 and 200 mM acetoin, but differed significantly in quantity in the presence of 300 mM acetoin, consistent with a major shift in metabolism to deal with these extreme conditions [5]. The intracellular concentrations of 6-phosphogluconate and of all intermediates of the non-oxidative part of the PP pathway were two to three times higher than those at lower acetoin concentrations, consistent with an increase in flux through the PP pathway. This suggests that fluxes through both the oxidative and non-oxidative parts of the PP pathway may be saturated, at the level of the 6-phosphogluconolactonase or 6-phosphogluconate dehydrogenase steps catalyzed by Sol3p and Gnd1p and at reactions catalyzed by one or several enzymes of the non-oxidative part of the pathway.

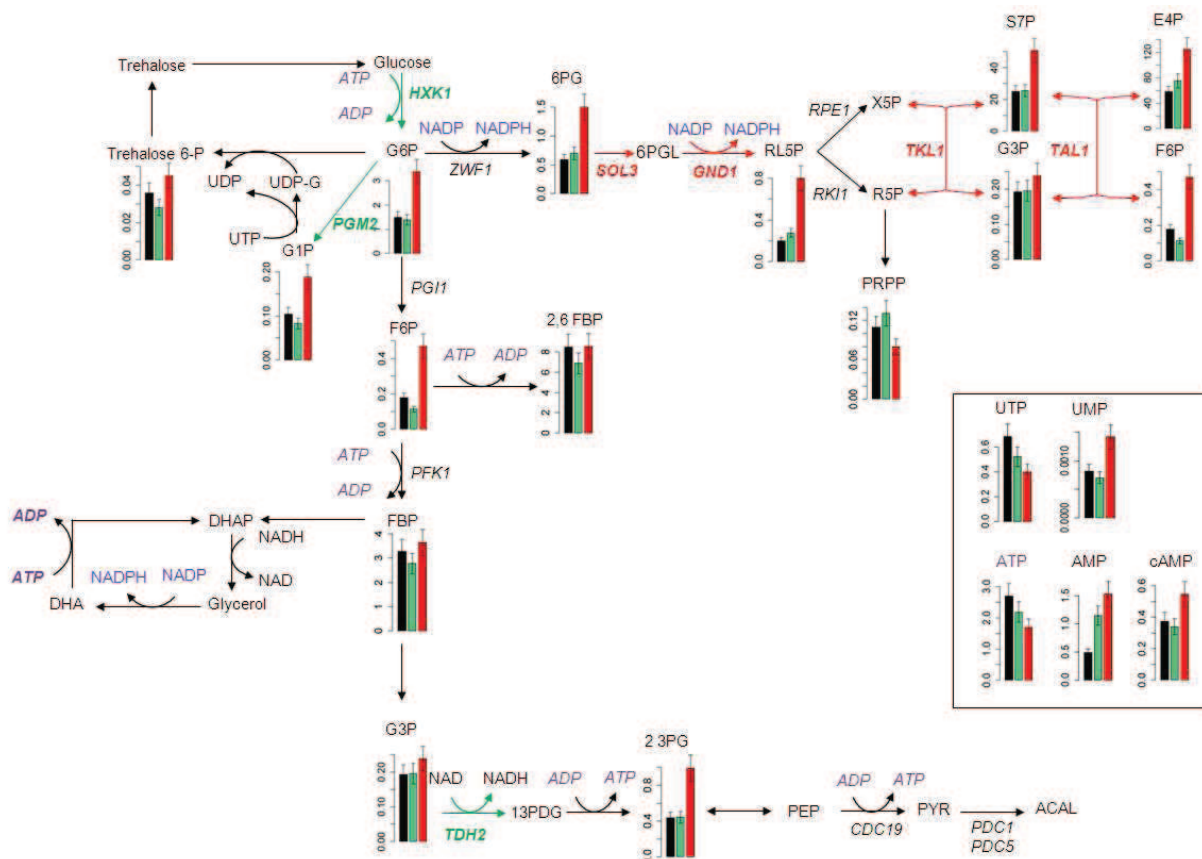


Figure 6 - Intracellular metabolite concentrations for the glycolysis, PP and carbohydrate pathways, following changes to NADPH demand. Intracellular metabolite concentrations ($\mu\text{mol/gDW}$) for NADPH-Bdh in the presence of 100 (black), 200 (green) and 300 (red) mM acetoin. The genes upregulated and downregulated in the NADPH-Bdh strain in the presence of 300 mM acetoin are indicated in red and green, respectively.

By contrast, the concentration of phosphoribosyl pyrophosphate (PRPP) decreased, consistent with the preferential rerouting of carbons through the non-oxidative part of PP pathway, at the expense of the purine and pyrimidine synthesis pathways.

We also determined the concentrations of adenine nucleotides. The concentrations of the triphosphates decreased in response to increasing NADPH demand, by factors of 1.6 for ATP and 1.8 for UTP. By contrast, those of the monophosphate forms increased, by a factor of 2 for AMP and 1.6 for UMP. These findings indicate that there was an energy imbalance in the NADPH-Bdh strain in the conditions causing the greatest modification of NADPH demand. AXP concentration is one of the major factors controlling the regulation of the glycolysis and carbohydrate pathways. The glycolytic intermediates glucose 6-phosphate (G6P) and F6P accumulated,

whereas the concentrations of G3P, 1,6-fructose-biphosphate (FBP) and fructose-2,6-bisphosphate (2,6 FBP) were similar at all levels of NADPH demand. This accumulation may result from a decrease in phosphofructokinase activity due to a decrease in ATP availability or from an increase in glycolytic flux, as previously observed in the presence of 300 mM acetoin (data not shown).

The UDP-glucose pyrophosphorylase (Ugp1p) is involved in the synthesis of UDP-glucose, a precursor of reserve carbohydrates, from glucose-1-phosphate (G1P). The accumulation of G1P observed in the presence of 300 mM acetoin may reflect a limitation of the flux through Ugp1p, due to a decrease in UTP availability.

An accumulation of 2-phosphoglycerate and 3-phosphoglycerate (measured as a single pool, denoted 2,3 PG) was also observed.

Compound (mg/L)	NADPH-Bdh				NADH-Bdh			
Acetoin initial (mM)	0	100	200	300	0	100	200	300
Acetoin consumed (mM)	0	100	150	245	0	100	160	164
Acetaldehyde	4.4	4.3	4.7	7.0	4.5	51.8	123.9	151.1
Ethyl hexanoate	0.13	0.09	0.08	0.03	0.15	0.12	0.06	0.05
Ethyl octanoate	0.23	0.13	0.13	0.04	0.28	0.16	0.06	0.04
Ethyl decanoate	0.16	0.02	< 0.01	< 0.01	0.13	0.06	< 0.01	< 0.01
Ethyl acetate	19.3	28.8	30.5	37.7	19.1	31.0	52.5	53.4
Isoamyl alcohol	25.6	27.1	27.5	27.8	24.9	26.8	29.1	29.5
Isoamyl acetate	0.70	0.88	0.90	0.55	0.83	0.80	0.74	0.74
Isobutanol	5.5	N.D.	5.9	8.0	4.8	7.7	10.2	11.3
Isobutyl acetate	0.06	0.06	0.05	0.08	0.03	0.32	0.95	1.21
Propanol	16.3	17.1	16.5	16.3	15.3	21.1	25.1	29.3
Phenyl ethanol	16.8	26.4	N.D.	53.0	N.D.	6.8	7.6	8.5

Table 3 - Acetaldehyde, higher alcohols and esters produced by NADPH-Bdh and NADH-Bdh strains in response to various levels of redox disturbance. N.D. not determined.

Impact of changes in NADPH and NADH availability on aroma compounds

The formation of volatile compounds during fermentation is strongly influenced by redox status and may provide an overall picture of redox modifications in central carbon metabolism (CCM). We therefore investigated the impact of changes in NADPH and NADH availability on key aromatic markers (acetaldehyde, higher alcohols, acetate and ethyl esters). Acetaldehyde accumulated in large amounts, but only in response to changes in NADH levels (Table 3), whereas acetate accumulated in response to changes in the availability of either NADH or NADPH (Figure 2B). The increase in acetate release therefore probably reflects limitation of the alcohol dehydrogenase reaction from a low NADH demand. By contrast, increases in NADPH demand resulted in the rerouting of carbons towards acetate, to satisfy this demand (Table 2).

The changes in ester production profiles probably reflect decreases in the

availability of acetyl-CoA [25], a precursor of these molecules, as suggested by the

lower level of flux through acetyl-CoA synthase (Table 3). Increases in the oxidation of NADH or NADPH (Table 3) decreased the overall production of ethyl esters, which are generated by the condensation of ethanol and a fatty acid derivative. By contrast, acetate esters, which are produced by the condensation of a higher alcohol and acetyl-CoA, did not change significantly abundance, with the exception of isoamyl acetate at the highest acetoin concentration. This suggests that the alcohol-*O*-acetyltransferase responsible for catalyzing this reaction may be less sensitive to acetyl-CoA concentration than the esterases involved in ethyl ester synthesis. However, the ethyl acetate production did increase (Table 3), consistent with the observed increase in acetate concentration (Table 2, Figure 2B). Surprisingly, despite the involvement of this pathway in NAD⁺-regeneration, the level of isobutanol production was 2.4 times higher in cells in which NADH levels were modified than in control cells. Furthermore, the most significant effect of NADH oxidation was a large increase in isobutyl acetate production. By contrast, these two compounds were not affected by the modification of NADPH demand.

Isobutanol is synthesized from valine, which is produced from α -acetolactate, a compound also involved in acetoin synthesis. We suggest that the synthesis of acetoin by the PDC route is favoured in conditions of acetaldehyde accumulation (as described by Heux et al. [26]), and that α -acetolactate is rerouted towards the production of valine, isobutanol and isobutyl acetate. A key mechanism underlying this remodeling of flux may be the increase in PDC5 gene expression observed in response to NADH oxidation (Table 1). PDC5 encodes a protein involved in the decarboxylation step of the Ehrlich pathway. The production of fused alcohol should therefore increase in response to NADH. This was, indeed, observed for propanol, the synthesis of which doubled in response to NADH oxidation but was unaffected by increases in NADPH oxidation (Table 3).

Finally, NADPH oxidation tripled phenylethanol production. The precursor of this higher alcohol is erythrose-4-phosphate, an intermediate of the PP pathway. This result is therefore consistent with an increase in flux through the PP pathway (Table 2).

Discussion

We investigated the molecular processes involved in the maintenance of intracellular NADPH homeostasis, by studying the fluxomic, metabolic and transcriptional responses to increases in NADPH oxidation in *S. cerevisiae*. The biological system used, which was based on the overproduction of an NADPH-dependent Bdh1p enzyme and the use of acetoin as an electron acceptor, made it possible to impose unprecedented levels of redox disturbance on yeast cells, corresponding to 22 times the anabolic demand for NADPH [5].

We showed in a previous metabolic mass analysis (MMA) that (i) yeast responds to increases in NADPH demand by increasing

the flux through the two main NADPH-producing pathways (the PP and acetate pathways) (ii) for NADPH demands of more than 22 times the anabolic demand, the PP pathway was saturated and additional NADPH was produced through the glycerol-DHAP cycle, involving exchanges of the NADH and NADPH redox cofactors. In this study, we characterized the mechanisms involved in flux rerouting for two moderate (100 and 200 mM acetoin) and one large (300 mM) increase in NADPH, corresponding to 8, 12 and 22 times the anabolic NADPH demand, respectively. In these conditions, little effect on growth was observed only for the two highest levels of NADPH demand, consistent with a decrease in biomass synthesis due to a lack of NADPH.

Regulatory mechanisms involved in the rerouting of carbon to NADPH-producing pathways

We combined ^{13}C -based metabolic flux, intracellular metabolite and global gene expression analyses, to investigate the way in which yeast adjusts its metabolism to respond to a high NADPH demand. We first confirmed experimentally that carbon was rerouted principally to the acetate and the PP pathways for the generation of NADPH. Flux through the PP pathway, which was estimated by ^{13}C flux analysis, was increased by factors of 1.6, 2.4 and 2.9 in the presence of 100, 200 and 300 mM acetoin, respectively, consistent with the predictions of the DynamoYeast model [5].

We showed that the response of yeast to an increase in NADPH demand to eight times the anabolic demand was mediated mostly by enzymatic control, as no transcriptional regulation of the genes involved in the acetate and PP pathways was observed. However, further increases in NADPH demand resulted in the induction of several PP pathway genes. In the presence of 200 mM and 300 mM acetoin, two genes of the oxidative pathway (SOL3 and GND1)

were upregulated and, in the presence of 300 mM acetoin, another two genes (TAL1 and TKL1) from the non-oxidative pathway were also overexpressed. These genes were probably upregulated to increase the flux capacity of the PP pathway, which was saturated in these conditions, as shown by the accumulation of PP pathway intermediates (Figure 6). Both metabolic and genetic controls are therefore required to cover a demand for NADPH more than eight times greater than the anabolic demand for this compound.

GND1 upregulation has been observed in various situations in which the flux through the PP pathway increases [27, 28]. This is not surprising, because this gene encodes a protein that catalyzes an irreversible reaction. By contrast, ZWF1, which encodes a protein that catalyzes the first irreversible NADPH-producing reaction of this pathway, was not regulated. This is particularly surprising, because changes in the abundance of the first enzyme are often used to regulate flux through a pathway. These findings may be accounted for by differences in the cost of the proteins encoded by these genes. Indeed, a recent study in *Escherichia coli* suggested that the production of enzymes with a high cost (estimated from their abundance and molecular weight) is more tightly controlled than that of enzymes with a lower cost [29]. If the same is true in yeast, it would account for the transcriptional regulation of GND1 rather than ZWF1, because the cost of Gnd1p is 10 times that of Zwflp [30].

We initially hypothesized that the transcription factor Stb5p might be involved in the maintenance of redox homeostasis under anaerobic conditions. However, only eight of the 69 Stb5p target genes [7] (including 4 PP pathway genes) displayed differential regulation (Table 1, Additional file 1), consistent with Stb5p playing no role in the redirection of flux observed in response to increases in

NADPH oxidation. This low proportion of Stb5p target genes responding to NADPH/NADP⁺ imbalance suggests that Stb5p does not sense NADPH changes directly during oxidative stress.

Indirect effects of changes in NADPH demand on amino-acid synthesis

The other main changes in transcription concerned the synthesis of amino acids, particularly the NADPH-consuming methionine and lysine pathways and serine synthesis, which is strongly connected to the methionine pathway. This adaptive response is consistent with the regulation of these amino-acid pathways: the fluxes through these pathways are limited by low NADPH availability, resulting in lower intracellular concentrations of the final product and derepression of the pathway. The relationship between the PP phosphate pathway and the sulfur pathway has long been known [31] and is illustrated by the sensitivity to osmotic stress of a *zwf1* mutant. However, the connection between these two pathways does not involve transcriptional regulation, as no common regulator of the genes of these two pathways has been identified. However, Met4p, the main activator of the sulfur pathway, can also bind GND2, the minor isoform of the 6-phosphogluconate dehydrogenase [32].

The energy problem and the glycerol-DHA cycle

Analysis of the metabolic response to an NADPH demand 22 times greater than anabolic demand revealed a metabolic shift that we attributed to saturation of the PP pathway [5]. This conclusion is consistent with the intracellular metabolite profiles obtained in this study. Moreover, a previous constraint-based metabolic flux analysis suggested that a glycerol-DHA cycle exchanging NADH for NADPH was activated in these conditions [5]. The intracellular metabolite profile revealed energetic inconsistencies (Figure 6), consistent with the hypothetical operation

of this cycle. Indeed, the ATP and UTP pools were markedly smaller in the presence of 300 mM acetoin than in the presence of the other two concentrations of this compound, consistent with the stimulation of glycolysis [33]. Furthermore, glycolytic flux increased with the intensity of change in NADPH demand (data not shown).

Flux toward acetaldehyde, via pyruvate decarboxylase, increased, at the expense of the reactions supplying the TCA pathway. The NADPH imbalance results in the rerouting of the carbon atoms of acetaldehyde for the production of acetate via Ald6p. The marked accumulation of acetate when the cells were incubated in the presence of 300 mM acetoin (Figure 2B) probably resulted from a lower level of flux through acetyl-CoA synthase (Acs1p), resulting from both ATP limitation and a smaller acetyl-CoA requirement for lipid biosynthesis. Consistent with the limited production of acetyl-CoA, the production of acetate esters and fatty acids from this precursor decreased in response to increases in NADPH demand.

Conclusion

This study highlights the remarkable robustness of yeast to changes in NADPH demand, based on efficient mechanisms for the reprogramming of metabolic flux to produce large amounts of NADPH. Yeast cells make use of metabolic control mechanisms to adapt rapidly to increases in NADPH demand to up to eight times the anabolic demand. At an extreme modification of NADPH demand, we revealed that the yeast implements a hierarchical transcriptional regulation which is added to metabolic control for increasing the capacity of the PP pathway when the flux through this pathway tends at its maximum in order to supply the totality of NADPH demand.

Methods

Strains and culture conditions

The strains used in this study were derived from the *S. cerevisiae* haploid strain 59A [34]. Strains NADH-Bdh and NADPH-Bdh were obtained by overexpressing the BDH1 gene encoding the NADH-dependent 2,3-butanediol dehydrogenase (Bdh1p) or a mutated version of this gene [35] encoding an NADPH-dependent Bdh1p [5]. Overexpression was achieved by replacing the chromosomal BDH1 promoter with the TDH3 promoter and, for NADPH-Bdh, by replacing the native ORF with the mutated ORF.

S. cerevisiae strains were maintained and grown at 28°C on YPD medium (1% Bacto yeast extract, 2% Bacto peptone, 2% glucose). An aliquot of each culture was mixed with glycerol to a final concentration of 20%, frozen and stored at -80°C.

Fermentation medium and growth conditions

Batch fermentations were performed in one-liter bioreactors equipped with fermentation locks for the maintenance of anaerobiosis, at 28°C, with continuous stirring (500 rpm). Fermentation experiments were carried out in SD minimal medium (13.4 % yeast nitrogen base without amino acids, 100 % glucose). The SD minimal medium was supplemented with 1.25 mg/l ergosterol, 0.164 g/l Tween 80, and 0.35 mg/l oleic acid, to satisfy the lipid requirements of the yeast cells during anaerobic growth. Acetoin was added at various concentrations (from 0 to 300 mM) at the start of fermentation, as previously described by Celton et al. [5]. Bioreactors were inoculated to a final OD₆₀₀ of 0.05, with cells from a YPD preculture in 50 ml of medium in a 250 ml flask, which had been incubated at 28°C, with shaking. Fermentations were performed at 28°C. CO₂ release was determined by automatic measurements of fermentor weight loss at

20-minute intervals. The rate of CO₂ production (dCO₂/dt) is the first derivative of the amount of CO₂ produced per unit time and was calculated automatically by polynomial smoothing of the CO₂ production curve [36]. Fermentation experiments were performed in triplicate.

Analytical methods

Yeast growth was monitored by measuring the optical density of the culture at 600 nm (OD₆₀₀). Glucose and acetate were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) with an Aminex HPX-87H ion exchange column. Volatile compounds were determined by GC-FID analysis, with a headspace autosampler and a BP20 (SGE).

Microarray analysis

The cells of studied conditions NADH-Bdh 200 mM, NADPH-Bdh 100 mM, 200mM and 300 mM acetoin were performed independently. Each condition is represented by three independent cultures. Aliquots of 1x10⁹ cells were sampled from the fermentation medium when CO₂ production reached 6 g/l/h. Cells were collected by centrifugation at 1000 g for 5 min at 4°C and the cell pellets were washed with DEPC-treated water and frozen in methanol at -80°C. Total RNA was extracted with Trizol reagent (Gibco BRL, Life Technologies) [37] and purified with the "RNA Cleanup kit" (Qiagen). We checked the quantity and quality of the extracted RNA by spectrometry (NanoDrop 1000, Thermo Scientific). The DNA microarrays were manufactured at the Biochip platform of Toulouse–Genopole, on dendrislides [38], with 70-mer oligonucleotides covering 99% of the yeast genome (Operon Inc.; a list of the corresponding genes is available from <http://biopuce.insatoulouse.fr/oligosets/>). Fluorescent cDNAs were synthesized from 5 µg of total RNA with the CleanUP System (Promega). Labeled cDNA was purified with the Pronto Purification kit (Promega). To perform an inter-slides

analysis, cDNA of each condition was hybridized with cDNA of 59A strain, used as control. Gene expression was analyzed between to expression profile of 59A, used as control, in order to compare the gene expression of different conditions. Slides were hybridized in static conditions for 16 h in 42°C in a hybridization chamber (Corning), with the Pronto Universal Hybridization Quick kit.

Transcriptomic data acquisition and statistical analysis

Hybridization signals were detected with a GenePix 4000B laser scanner (Axon Instruments). Array images were acquired and quantified with integrated GenePix software version 3.0. Statistical analysis was done with R.2.11.1 software [39]. The limma package [40–42] was used to normalize the microarray data (by the print-tip-loess method for normalization within the array followed by the quantile method for normalization between arrays). Differential expression between two sets of experimental conditions was detected by carrying out a modified t-test, with a significant threshold of $p < 5 \times 10^{-2}$, applying the Benjamini and Hochberg false discovery rate to correct for multiple testing [43]. Only genes displaying a fold-change of at least 1.5 (positive or negative) in expression level were considered. Genes displaying differential expression were grouped according to Gene Ontology (GO) process terms, with the database for annotation, visualization and integrated discovery (DAVID), beta version 6.7 [45]. The complete data set is available through the Gene Expression Omnibus database (accession number GSE).

Extraction and determination of intracellular metabolites

Sampling for intracellular metabolites were analyzed from two independent cultures of each level of NADPH demand (NADPH-Bdh 100 mM, 200mM and 300 mM acetoin) and carried out when CO₂ production reached 6 g/l/h. Cells (0.5 to

1.95 x 10⁸) were added to 5 ml of methanol solution (40 % vol/vol) to quench their metabolism. They were then collected by centrifugation (15000 g, 1 min, -10 °C) and stored at -80°C. Extraction and analysis were carried out at the MetaToul Platform, Toulouse. Ethanol (5 µl of a 75% v/v solution) and 250 µl of internal standard (IDMS 1/40) were added to the cell pellets and metabolites were extracted by incubating the mixture for three minutes at 80°C. The samples were cooled on ice and centrifuged at 15000 g for 10 minutes. Ethanol was removed by evaporation and the metabolites were resuspended in 250 µl ultra-pure H₂O and centrifuged at 20000 g for two minutes. Intracellular metabolites were analyzed by high-pressure anion exchange chromatography in a Dionex ICS 2000 machine (Dionex, USA) equipped with an AS11 analytical column (2 x 50 mm). Mass spectra were acquired with a QTrap 4000 electrochemical detector (Applied Biosystems) equipped with a Sciex Turbo V MSD (Toronto) for ESI electrospray ionization and MRM (Multiple Reaction Monitoring) in detector mode.

¹³C flux analysis

Cells were grown in penicillin flasks filled with MS medium (10 ml) supplemented with 100 mg.l⁻¹ of a mixture of labeled (40% 1-¹³C-glucose) and unlabeled glucose and 1.4 mg.l⁻¹ of NH₄Cl as the sole nitrogen source. Cells were harvested at an OD₆₀₀ of 3.0, corresponding to mid-exponential growth phase, and hydrolyzed overnight with 6 M HCl for the determination of amino acids and labeling patterns. One glucose derivative (glucose pentacetate) and two amino-acid derivatives (ethyl chloroformate (ECF) and dimethyl formamide dimethyl acetal (DMFDMA)) were analyzed by GC-MS [44], as previously described by Gombert et al. [46]. From the raw GC-MS data, the summed fractional labeling (SFL) of each fragment was calculated as follow: $SFL = 100 \times [(1.m_1 + 2.m_2 + \dots + n.m_n)]$

$\times [(m_0 + m_1 + m_2 + \dots + m_n) - 1]$, with m_0 the fractional abundance of the lowest corrected mass and $m_i > 0$ the abundance of molecules with higher corrected masses.

The data set used for ¹³C-flux analysis included the 25 SFLs calculated from labeling experiments and 22 measured fluxes, including the drain of metabolic intermediates to biomass and the formation of seven metabolites, giving a total of 47 items of experimental data. The distribution of carbon in central carbon metabolism (CCM) was estimated with the metabolic model described by Gombert et al. [46], modified to take into account features specific to fermentation [47]. Flux calculations (60 reactions) were carried out with Matlab 7, as previously described [44, 46]. Differences between experimental and simulated SFLs and between experimental and simulated fluxes were minimized by an iterative procedure. Calculations were carried out 100 times and the fluxes reported are the means of the convergent solutions.

Authors' contributions

MC carried out the fermentation experiments, the transcriptomic and the fluxomic experiments, analyzed the data and drafted the manuscript. IS participated in the design of the study and performed the statistical analysis. AG and VF participated in the analysis of the data and helped to revise the manuscript. CC helped to analyze the ¹³C flux and metabolic data, participated in the conception of the study and helped to draft the manuscript. SD conceived the study, participated in its coordination and helped to draft the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

We thank Lindsay Peyriga of the MetaSys (Functional Analysis of Metabolic Systems Platform), Toulouse, France, for the

extraction and analysis of intracellular metabolites. We also thank Pierre Delobel for assistance with microarray analysis. This study was supported by the INRA AgroBi 2006-2008 program.

References

- Nielsen J: **It is all about metabolic fluxes.** *J. Bacteriol* 2003, **185**:7031.
- Bro C, Regenberg B, Forster J, Nielsen J: **In silico aided metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved bioethanol production.** *Met Eng* 2006, **8**:102-111.
- Heux S, Cadiere A, Dequin S: **Glucose utilization of strains lacking *PGII* and expressing a transhydrogenase suggests differences in the pentose phosphate capacity among *Saccharomyces cerevisiae* strains.** *FEMS Yeast Res* 2008, **8**:217-224.
- Michnick S, Roustan JL, Remize F, Barre P, Dequin S: **Modulation of glycerol and ethanol yields during alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressed or disrupted for *GPD1* encoding glycerol 3 phosphate dehydrogenase.** *Yeast* 1997, **13**:783-793.
- Celton M, Goelzer A, Camarasa C, Fromion V, Dequin S: **A system biology analysis of the metabolic consequences of increased NADPH oxidation in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Met Eng*, in press.
- Vaseghi S, Baumeister A, Rizzi M, Reuss M: **In vivo dynamics of the pentose phosphate pathway in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Met Eng* 1999, **1**:128-140.
- Larochelle M, Drouin S, Robert F, Turcotte B: **Oxidative stress-activated zinc cluster protein Stb5 has dual activator/repressor functions required for pentose phosphate pathway regulation and NADPH production.** *Mol Cell Biol* 2006, **26**:6690-6701.
- Akache B, Wu K, Turcotte B: **Phenotypic analysis of genes encoding yeast zinc cluster proteins.** *Nucl Acids Res* 2001, **29**:2181.
- Hector RE, Bowman MJ, Skory CD, Cotta MA: **The *Saccharomyces cerevisiae* YMR315W gene encodes an NADP (H)-specific oxidoreductase regulated by the transcription factor Stb5p in response to NADPH limitation.** *New Biotechnol* 2009, **26**:171-180.
- Matsufuji Y, Nakagawa T, Fujimura S, Tani A, Nakagawa J: **Transcription factor Stb5p is essential for acetaldehyde tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*.** *J Basic Microbiol* 2010, **50**:494-498.
- Cadière A, Galeote V, Dequin S: **The *Saccharomyces cerevisiae* zinc factor protein Stb5p is required as a basal regulator of the pentose phosphate pathway.** *FEMS Yeast Res* 2010, **10**:819-827.
- De Smidt O, Du Preez JC, Albertyn J: **The alcohol dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*: a comprehensive review.** *FEMS Yeast Res* 2008, **8**:967-978.
- Blomberg A: **Metabolic surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to saline conditions: questions, some answers and a model.** *FEMS Microbiol Lett* 2000, **182**:1-8.
- Park H, Hwang YS: **Genome-wide transcriptional responses to sulfite in *Saccharomyces cerevisiae*.** *J Microbiol* 2008, **46**:542-548.
- Kaiser P, Su NY, Yen J, Ouni I, Flick K: **The yeast ubiquitin ligase SCF^{Met30}: connecting environmental and intracellular conditions to cell division.** *Cell Div* 2006, **1**:16.
- Thomas D, Cherest H, Surdin-Kerjan Y: **Identification of the structural gene for glucose-6-phosphate dehydrogenase in yeast. Inactivation leads to a nutritional requirement for organic sulfur.** *EMBO J* 1991, **10**:547.
- Hansen J, Francke Johannesen P: **Cysteine is essential for transcriptional regulation of the sulfur assimilation genes in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Mol Gen Genet* 2000, **263**:535-542.
- Albers E, Laizé V, Blomberg A, Hohmann S, Gustafsson L: **Ser3p (Yer081wp) and Ser33p (Yil074cp) are phosphoglycerate dehydrogenases in *Saccharomyces cerevisiae*.** *J Biol Chem* 2003, **278**:10264.
- Vargas RC, Garcia-Salcedo R, Tenreiro S, Teixeira MC, Fernandes AR, Ramos J, Sa-Correia I: ***Saccharomyces cerevisiae* multidrug resistance transporter Qdr2 is implicated in potassium uptake, providing a physiological advantage to quinidine-stressed cells.** *Euk Cell* 2007, **6**:134.
- González E, Fernández MR, Larroy C, Parés X, Biosca JA: **Characterization and functional role of *Saccharomyces cerevisiae* 2, 3-butanediol dehydrogenase.** *Chem Biol Interact* 2001, **130**:425-434.
- Heer D, Heine D, Sauer U: **Resistance of**

- Saccharomyces cerevisiae* to high concentrations of furfural is based on NADPH-dependent reduction by at least two oxireductases. *Appl Environ Microbiol* 2009, **75**:7631.
22. Katz M, Frejd T, Hahn Hägerdal B, Gorwa Grauslund MF: **Efficient anaerobic whole cell stereoselective bioreduction with recombinant *Saccharomyces cerevisiae*.** *Biotechnol Bioeng* 2003, **84**:573-582.
 23. Liu ZL, Moon J: **A novel NADPH-dependent aldehyde reductase gene from *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632 involved in the detoxification of aldehyde inhibitors derived from lignocellulosic biomass conversion.** *Gene* 2009, **446**:1-10.
 24. Bowman MJ, Jordan DB, Vermillion KE, Braker JD, Moon J, Liu ZL: **Stereochemistry of furfural reduction by an aldehyde reductase from *Saccharomyces cerevisiae* that contributes to *in situ* furfural detoxification.** *Appl Environ Microbiol* 2010 **76**:4926-4932.
 25. Verstrepen KJ, Moonjai N, Bauer FF, Derdelinckx G, Dufour JP, Winderickx J, Thevelein JM, Pretorius IS, Delvaux FR: **Genetic regulation of ester synthesis in yeast: new facts, insights and implications for the brewer.** *Brewing Yeast Fermentation Performance* 2003:234-248.
 26. Heux S, Cachon R, Dequin S: **Cofactor engineering in *Saccharomyces cerevisiae*: Expression of a H₂O-forming NADH oxidase and impact on redox metabolism.** *Met Eng* 2006, **8**:303-314.
 27. Krüger A, Grüning NM, Wamelink MMC, Kerick M, Kirpy A, Parkhomchuk D, Bluemlein K, Schweiger MR, Soldatov A, Lehrach H: **The pentose phosphate pathway is a metabolic redox sensor and regulates transcription during the anti-oxidant response.** *Antioxid Redox Signal* 2011(ja).
 28. Sonderegger M, Jeppsson M, Hahn-Hägerdal B, Sauer U: **Molecular basis for anaerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae* on xylose, investigated by global gene expression and metabolic flux analysis.** *Appl Environ Microbiol* 2004, **70**:2307.
 29. Wessely F, Bartl M, Guthke R, Li P, Schuster S, Kaleta C: **Optimal regulatory strategies for metabolic pathways in *Escherichia coli* depending on protein costs.** *Mol Syst Biol* 2011, **7**:515.
 30. Lu P, Vogel C, Wang R, Yao X, Marcotte EM: **Absolute protein expression profiling estimates the relative contributions of transcriptional and translational regulation.** *Nat Biotechnol* 2006, **25**:117-124.
 31. Slekar KH, Kosman DJ, Culotta VC: **The yeast copper/zinc superoxide dismutase and the pentose phosphate pathway play overlapping roles in oxidative stress protection.** *J Biol Chem* 1996, **271**:28831.
 32. Harbison CT, Gordon DB, Lee TI, Rinaldi NJ, Macisaac KD, Danford TW, Hannett NM, Tagne JB, Reynolds DB, Yoo J: **Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome.** *Nature* 2004, **431**:99.
 33. Larsson C, Nilsson A, Blomberg A, Gustafsson L: **Glycolytic flux is conditionally correlated with ATP concentration in *Saccharomyces cerevisiae*: a chemostat study under carbon-or nitrogen-limiting conditions.** *J Bacteriol* 1997, **179**:7243.
 34. Ambroset C, Petit M, Brion C, Sanchez I, Delobel P, Guérin C, Chiapello H, Nicolas P, Bigey F, Dequin S: **Deciphering the molecular basis of wine yeast fermentation traits using a combined genetic and genomic approach.** *G3*: 2011, **1**:263-281.
 35. Ehsani M, Fernández MR, Biosca JA, Dequin S: **Reversal of coenzyme specificity of 2, 3-butanediol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae* and *in vivo* functional analysis.** *Biotechnol Bioeng* 2009, **104**:381-389.
 36. Sablayrolles JM, Barre P, Grenier P: **Design of a laboratory automatic system for studying alcoholic fermentations in anisothermal enological conditions.** *Biotechnol Tech* 1987, **1**:181-184.
 37. Chomczynski P, Sacchi N: **Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.** *Analytical Biochem* 1987, **162**:156-159.
 38. Le Berre V, Trévisiol E, Dagkessamanskaia A, Sokol S, Caminade AM, Majoral JP, Meunier B, François J: **Dendrimeric coating of glass slides for sensitive DNA microarrays analysis.** *Nucl Acids Res* 2003, **31**:e88.
 39. Team R: **R: A language and environment for statistical computing.** *R Foundation for Statistical Computing Vienna Austria* 2010(01/19).
 40. Smyth GK, Michaud J, Scott HS: **Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments.** *Bioinformatics*

- 2005, **21**:2067.
41. Smyth GK: **Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments.** *Statistical Appl Gen Mol Biol* 2004, **3**:3.
42. Smyth GK, Speed T: **Normalization of cDNA microarray data.** *Methods* 2003, **31**:265-273.
43. Benjamini Y, Drai D, Elmer G, Kafkafi N, Golani I: **Controlling the false discovery rate in behavior genetics research.** *Behavioural Brain Res* 2001, **125**:279-284.
44. Christensen B, Nielsen J: **Isotopomer analysis using GC-MS.** *Met Eng* 1999, **1**:282-290.
45. Huang DW, Sherman BT, Tan Q, Kir J, Liu D, Bryant D, Guo Y, Stephens R, Baseler MW, Lane HC: **DAVID Bioinformatics Resources: expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists.** *Nucl Acids Res* 2007, **35**(suppl 2):W169.
46. Gombert AK, Moreira dos Santos M, Christensen B, Nielsen J: **Network identification and flux quantification in the central metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* under different conditions of glucose repression.** *J Bacteriol* 2001, **183**:1441.
47. Heux S: **Ingénierie métabolique et analyse ¹³C-flux du métabolisme central des levures *Saccharomyces cerevisiae* œnologiques.** *PhD thesis.* Université de Bourgogne; 2006.

ADDITIONAL FILE

Additional file 1 – List of regulated genes.

A- NADPH-Bdh (100 mM acetoin) versus 59A (without acetoin).

ORF	Name	logFC	FC	adj.P.Val
YAL060W	BDH1	1.400	2.64	5.0E-03
YBR301W	PAU24	1.039	2.05	3.5E-02
YGL157W	ARI1	1.013	2.02	1.5E-02
YIL176C	PAU14	0.976	1.97	1.5E-02
YJL223C	PAU1	0.957	1.94	1.5E-02
YBR237W	PRP5	-0.843	-1.79	1.6E-02
YBR246W	RRT2	-0.899	-1.86	4.7E-02
YIL174W	YIL174w	-1.167	-2.25	1.5E-02

B- NADPH-Bdh (200 mM acetoin) versus 59A (without acetoin).

ORF	Name	logFC	FC	adj.P.Val
YAL060W	BDH1	3.48770867	11.22	1.3E-11
YCR105W	ADH7	3.08286108	8.47	1.5E-05
YAL046C	YAL046c	2.37987866	5.20	4.4E-09
YGL157W	ARI1	2.00832192	4.02	5.0E-09
YOL161C	YOL161c	1.84817165	3.60	2.3E-03
YLR461W	PAU4	1.79571558	3.47	1.4E-03
YLR037C	DAN2	1.49493866	2.82	5.5E-03
YEL049W	PAU2	1.4824458	2.79	2.9E-03
YBR301W	DAN3	1.48136769	2.79	3.7E-03
YJL223C	PAU1	1.39986028	2.64	1.8E-02
YGL261C	YGL261c	1.39570313	2.63	3.9E-03
YGR294W	YGR294w	1.33365384	2.52	5.6E-03
YLL025W	PAU17	1.3244829	2.50	1.9E-03
YNR076W	PAU6	1.29749288	2.46	9.8E-03
YLR009W	RLP24	1.2432951	2.37	1.3E-02
YMR307W	GAS1	1.20107153	2.30	1.3E-03
YIL176C	YIL176c	1.18116753	2.27	4.7E-03
YAR020C	PAU7	1.16646034	2.24	1.4E-02
YER081W	SER3	1.09306744	2.13	8.3E-07
YKL001C	MET14	1.06282862	2.09	1.4E-03
YHL046C	YHL046c	1.01969735	2.03	3.1E-02
YLL064C	YLL064c	1.01061423	2.01	1.3E-02
YCR104W	PAU3	1.00398227	2.01	2.0E-02
YDR542W	YDR542w	1.00367867	2.01	1.8E-02

YNR050C	LYS9	0.99242363	1.99	1.6E-03
YER010C	YER010c	0.98475022	1.98	1.7E-03
YHR163W	SOL3	0.90766695	1.88	3.2E-05
YHR006W	STP2	0.90665386	1.87	3.8E-02
YIL094C	LYS12	0.89264891	1.86	1.7E-05
YLR303W	MET17	0.88925358	1.85	1.4E-04
YCR107W	AAD3	0.86421401	1.82	2.8E-02
YIR041W	PAU15	0.83675422	1.79	4.5E-02
YHR183W	GND1	0.80301987	1.74	2.5E-03
YNL030W	HHF2	0.80120885	1.74	1.6E-03
YCL020W	YCL020w	0.79146564	1.73	3.9E-03
YML024W	RPS17a	0.75909797	1.69	1.9E-03
YMR045C	YMR045c	0.75630803	1.69	2.0E-03
YGL030W	RPL30	0.72290901	1.65	3.5E-03
YGR148C	RPL24b	0.7228066	1.65	3.4E-03
YOL127W	RPL25	0.72132236	1.65	7.8E-03
YJR010W	MET3	0.71538383	1.64	2.0E-02
YLR367W	RPS22b	0.70794757	1.63	1.7E-03
YDL083C	RPS16b	0.69687317	1.62	1.6E-03
YNL067W	RPL9b	0.69666422	1.62	1.5E-03
YOL121C	RPS19a	0.69070666	1.61	2.3E-03
YNL178W	RPS3	0.68911478	1.61	1.1E-02
YER160C	YER160c	0.68679093	1.61	3.0E-03
YOL064C	MET22	0.67946278	1.60	5.1E-03
YDR541C	YDR541c	0.67835033	1.60	1.3E-02
YLR333C	RPS25b	0.67797109	1.60	2.9E-03
YOR312C	RPL20b	0.6729315	1.59	2.5E-03

YGR129W	SYF2	0.66590615	1.59	9.3E-03
YOR167C	RPS28a	0.65616617	1.58	8.8E-04
YPL046C	ELC1	0.65451417	1.57	1.1E-02
YDR447C	RPS17b	0.65038872	1.57	2.4E-03
YOR324C	FRT1	0.64429884	1.56	1.6E-03
YLR167W	RPS31	0.64291871	1.56	7.7E-03
YPR029C	APL4	0.63111106	1.55	2.4E-03
YGL031C	RPL24a	0.62817707	1.55	1.4E-02
YER117W	RPL23b	0.62696586	1.54	2.9E-03
YER091C	MET6	0.61566513	1.53	1.1E-03
YMR154C	RIM13	0.61529697	1.53	8.2E-03
YMR121C	RPL15b	0.60630887	1.52	4.0E-03
YER172C	BRR2	0.60612453	1.52	5.3E-03
YDL075W	RPL31a	0.60409411	1.52	4.1E-03
YPR035W	GLN1	0.60383928	1.52	1.6E-03
YKR094C	RPL40b	0.59615572	1.51	2.7E-02
YPL143W	RPL33a	0.59493163	1.51	4.0E-03
YER138C	YER138c	0.59381922	1.51	2.3E-03
YPR167C	MET16	0.58916043	1.50	9.4E-03
YDR471W	RPL27b	0.5873046	1.50	3.1E-03
YML131W	YML131w	-0.58714296	-1.50	4.1E-02
YDR360W	YDR360w	-0.5885948	-1.50	4.4E-03
YJL048C	UBX6	-0.5890264	-1.50	1.5E-02
YJL014W	CCT3	-0.58980052	-1.51	2.4E-03
YLR425W	TUS1	-0.59166004	-1.51	2.2E-02
YLR033W	RSC58	-0.59245259	-1.51	2.3E-03
YPL163C	SVS1	-0.60007324	-1.52	3.8E-03

YFL024C	EPL1	-0.60120349	-1.52	6.2E-03
YDR089W	YDR089w	-0.60335641	-1.52	3.6E-03
YOR083W	WHI5	-0.62364258	-1.54	1.1E-02
YMR271C	URA10	-0.62743535	-1.54	1.3E-02
YBR072W	HSP26	-0.62884536	-1.55	1.5E-02
YDR516C	EMI2	-0.63634954	-1.55	3.5E-02
YJL091C	GWT1	-0.64356368	-1.56	1.1E-02
YIR012W	SQT1	-0.65034479	-1.57	5.3E-03
YLL028W	TPO1	-0.65793671	-1.58	1.3E-02
YKL007W	CAP1	-0.66469264	-1.59	3.3E-02
YIL019W	FAF1	-0.66477655	-1.59	1.5E-02
YIL159W	BNR1	-0.67885048	-1.60	4.6E-02
YNR044W	AGA1	-0.68738832	-1.61	2.6E-02
YCL014W	BUD3	-0.72818705	-1.66	1.1E-02
YGL121C	GPG1	-0.72949979	-1.66	1.5E-02
YIL066C	RNR3	-0.73417074	-1.66	2.7E-02
YDR136C	VPS61	-0.74325995	-1.67	2.3E-03
YKR023W	YKR023w	-0.74639886	-1.68	2.6E-03
YLR044C	PDC1	-0.74741978	-1.68	6.6E-03
YJL079C	PRY1	-0.75178359	-1.68	1.6E-03
YPL058C	PDR12	-0.75187984	-1.68	4.9E-03
YLR178C	TFS1	-0.80093547	-1.74	1.0E-03
YPL274W	SAM3	-0.86166425	-1.82	1.6E-03
YFR053C	HXK1	-0.88800157	-1.85	5.9E-04
YGL255W	ZRT1	-0.9023985	-1.87	2.4E-03
YLR225C	YLR225c	-0.90380701	-1.87	1.0E-03
YPL095C	EEB1	-1.18681982	-2.28	1.2E-02

YNL110C	NOP15	-1.20001867	-2.30	4.8E-02
YDR521W	YDR521w	-1.31481632	-2.49	2.3E-02
YGL256W	ADH4	-2.3406409	-5.07	1.2E-04

C- NADPH-Bdh (300 mM acetoin) versus 59A (without acetoin).

ORF	Name	logFC	FC	adj.P.Val
YCR105W	ADH7	3.836876	14.29	3.8E-07
YAL060W	BDH1	3.635887	12.43	5.9E-12
YAL046C	AIM1	2.659101	6.32	5.8E-10
YGL157W	ARI1	1.88548	3.69	1.6E-08
YKL001C	MET14	1.646475	3.13	3.8E-06
YLR461W	PAU4	1.318088	2.49	7.9E-03
YEL049W	PAU2	1.237941	2.36	9.2E-03
YOL161C	PAU20	1.202202	2.30	3.0E-02
YER081W	SER3	1.192478	2.29	1.9E-07
YHR163W	SOL3	1.087714	2.13	1.5E-06
YAR020C	PAU7	1.085091	2.12	2.1E-02
YFR030W	MET10	1.047549	2.07	3.1E-04
YMR307W	GAS1	0.966515	1.95	3.5E-03
YER138C	YER138c	0.944864	1.93	1.3E-05
YER160C	YER160c	0.912296	1.88	1.9E-04
YMR045C	YMR045c	0.909499	1.88	2.2E-04
YCL020W	YCL020w	0.905448	1.87	1.2E-03
YLL025W	PAU17	0.897632	1.86	2.1E-02
YCR107W	AAD3	0.881751	1.84	2.5E-02
YNL231C	PDR16	0.864701	1.82	1.0E-02
YOR276W	CAF20	0.860812	1.82	1.9E-02
YER172C	BRR2	0.85701	1.81	2.3E-04
YHR135C	YCK1	0.853198	1.81	2.9E-04

YIL176C	PAU14	0.84923	1.80	3.8E-02
YJR137C	MET5	0.819016	1.76	3.8E-03
YML039W	YML039w	0.814898	1.76	1.5E-04
YIL074C	SER33	0.810696	1.75	2.5E-03
YIL094C	LYS12	0.808899	1.75	3.7E-05
YOL165C	AAD15	0.795056	1.74	8.8E-04
YLR303W	MET17	0.793354	1.73	2.2E-04
YLR297W	YLR297w	0.790808	1.73	1.6E-04
YPR035W	GLN1	0.788856	1.73	6.4E-05
YPR065W	ROX1	0.787979	1.73	5.5E-03
YOR052C	YOR052c	0.781325	1.72	6.9E-04
YKL085W	MDH1	0.777577	1.71	6.4E-04
YMR046C	YMR046c	0.755769	1.69	1.0E-04
YMR050C	YMR050c	0.751579	1.68	7.9E-05
YMR051C	YMR051c	0.75099	1.68	5.5E-03
YNR050C	LYS9	0.742744	1.67	7.9E-03
YAR009C	YAR009c	0.72552	1.65	2.0E-04
YDR541C	YDR541c	0.722445	1.65	8.5E-03
YER091C	MET6	0.722434	1.65	7.9E-05
YJR028W	YJR028w	0.719826	1.65	2.0E-04
YHR183W	GND1	0.714917	1.64	5.2E-03
YHL040C	ARN1	0.693533	1.62	2.6E-02
YOL064C	MET22	0.687877	1.61	4.6E-03
YJR029W	YJR029w	0.679959	1.60	4.5E-04
YPR167C	MET16	0.674514	1.60	3.5E-03

YGR155W	CYS4	0.669538	1.59	7.2E-04
YHR050W	SMF2	0.66456	1.59	1.3E-02
YCL019W	YCL019w	0.662353	1.58	1.6E-02
YOL109W	ZEO1	0.65685	1.58	3.8E-04
YHR021C	RPS27b	0.652936	1.57	7.9E-04
YDR327W	YDR327w	0.648263	1.57	2.8E-02
YGL030W	RPL30	0.640417	1.56	7.7E-03
YLR217W	YLR217w	0.632483	1.55	2.5E-03
YNL030W	HHF2	0.600228	1.52	7.9E-03
YOR136W	IDH2	0.595051	1.51	4.3E-03
Q0105	COb	0.592248	1.51	7.9E-03
YLR354C	TAL1	0.591502	1.51	1.3E-02
YDR252W	BTT1	0.58655	1.50	7.9E-03
YDR047W	HEM12	-0.588281	-1.50	9.0E-03
YMR173W	DDR48	-0.591506	-1.51	1.8E-02
YJR071W	YJR071w	-0.591594	-1.51	4.6E-03
YDR479C	PEX29	-0.594683	-1.51	4.0E-04
YML131W	YML131w	-0.595497	-1.51	3.8E-02
YLR134W	PDC5	-0.601638	-1.52	2.6E-03
YLR044C	PDC1	-0.610927	-1.53	2.4E-02
YIL121W	QDR2	-0.616578	-1.53	7.6E-04
YER001W	MNN1	-0.61939	-1.54	7.0E-03
YMR324C	YMR324c	-0.620886	-1.54	7.7E-03
YPL277C	YPL277c	-0.621944	-1.54	4.4E-02
YOR083W	WHI5	-0.626977	-1.54	1.0E-02

YJR113C	RSM7	-0.630661	-1.55	4.4E-02
YBR240C	THI2	-0.634588	-1.55	4.6E-03
Q0160	SCEi	-0.643386	-1.56	2.7E-03
YKL066W	YKL066w	-0.645574	-1.56	7.7E-04
YDR136C	VPS61	-0.645939	-1.56	5.4E-03
YNL158W	PGA1	-0.656976	-1.58	2.9E-04
YDL196W	YDL196w	-0.662765	-1.58	7.9E-03
YJL079C	PRY1	-0.67167	-1.59	2.5E-03
YIL171W	YIL171w	-0.684416	-1.61	3.0E-02
YCR041W	YCR041w	-0.686092	-1.61	1.1E-02
YCL047C	YCL047c	-0.694113	-1.62	2.0E-02
YGR008C	STF2	-0.697543	-1.62	1.4E-02
YHR121W	LSM12	-0.709181	-1.63	1.9E-02
YIL146C	ATG32	-0.720494	-1.65	2.0E-02
YKL070W	YKL070w	-0.742338	-1.67	2.0E-02
YDR516C	EMI2	-0.743075	-1.67	1.4E-02
YJR009C	TDH2	-0.752339	-1.68	1.9E-02
YHR080C	YHR080c	-0.795073	-1.74	2.5E-02
YMR105C	PGM2	-0.797078	-1.74	1.1E-02
YLR223C	IFH1	-0.800057	-1.74	5.7E-04
YBR226C	YBR226c	-0.833761	-1.78	1.2E-03
YOL002C	IZH2	-0.861535	-1.82	8.1E-04
YGL258W	VEL1	-0.96763	-1.96	3.7E-05
YPR098C	YPR098c	-0.995964	-1.99	3.6E-02
YFR053C	HXK1	-1.01941	-2.03	5.1E-05

YPL274W	SAM3	-1.032726	-2.05	1.5E-04
YLR178C	TFS1	-1.036899	-2.05	2.5E-05
YBR203W	COS111	-1.085406	-2.12	3.0E-02
YPL058C	PDR12	-1.105154	-2.15	1.5E-04
YNR058W	BIO3	-1.116363	-2.17	1.3E-03
YMR271C	URA10	-1.141228	-2.21	7.2E-05
YBR151W	APD1	-1.348356	-2.55	4.5E-02
YPR160W	GPH1	-1.387792	-2.62	1.3E-03
YGL255W	ZRT1	-1.767177	-3.40	7.9E-07
YPL095C	EEB1	-1.791669	-3.46	4.0E-04
YGL256W	ADH4	-3.380113	-10.41	4.1E-07

D- NADH-Bdh (200 mM acetoin) versus 59A (without acetoin).

ORF	Name	logFC	FC	adj.P.Val
YAL060W	BDH1	2.790408	6.92	8.4E-10
YCR105W	ADH7	2.140493	4.41	1.1E-03
YGL157W	ARI1	2.067908	4.19	4.4E-09
YAL046C	AIM1	1.859229	3.63	2.4E-07
YLR303W	MET17	0.917768	1.89	1.5E-04
YLR134W	PDC5	0.867484	1.82	2.3E-04
YFR030W	MET10	0.68322	1.61	4.1E-02
YOL165C	AAD15	0.67265	1.59	1.1E-02
YLR033W	RSC58	0.663129	1.58	1.3E-03
YLR109W	AHP1	0.654913	1.57	2.3E-04
YJL034W	KAR2	0.648293	1.57	1.5E-02
YLR056W	ERG3	0.599575	1.52	1.0E-03
YJR026W	YJR026w	-0.621129	-1.54	3.4E-02
YAR010C	YAR010c	-0.628069	-1.55	5.4E-03
YBR093C	PHO5	-0.642396	-1.56	4.4E-03
YPL268W	PLC1	-0.652863	-1.57	2.3E-03
Q0160	SCEi	-0.684539	-1.61	3.7E-03
YML040W	YML040w	-0.689826	-1.61	2.7E-04
YDR326C	YSP2	-0.690176	-1.61	2.4E-03
YOR083W	WHI5	-0.89252	-1.86	1.3E-03
YPL058C	PDR12	-0.985763	-1.98	1.1E-03
YPL095C	EEB1	-1.303132	-2.47	2.1E-02
YGL256W	ADH4	-1.897318	-3.73	1.1E-03

DISCUSSION GENERALE

L'objectif central de ce travail de thèse était d'améliorer notre compréhension du métabolisme du NADPH chez *S. cerevisiae* en condition de fermentation par une approche de biologie des systèmes. Une des questions clés du fonctionnement du réseau métabolique est de savoir comment la cellule maintient son bilan équilibré entre la formation et la consommation du NADPH.

Notre démarche a consisté (i) à augmenter *in vivo* de façon contrôlée la consommation de NADPH dans la cellule, (ii) à identifier les stratégies de réajustement des flux à travers les voies du métabolisme du NADPH, (iii) à estimer la contribution des voies cataboliques de production du NADPH en réponse à l'augmentation de la demande en NADPH, (iv) puis à déterminer la part des régulations métaboliques et génétiques qui module les flux afin de maintenir l'homéostasie redox.

Une des difficultés liées à l'étude du métabolisme NADPH réside dans l'implication de ce cofacteur dans plus de 80 réactions (Nielsen, 2003). De ce fait, une perturbation du ratio NADPH/NADP⁺ a un large impact sur le réseau métabolique. Alors que les recherches précédentes ont privilégié des approches locales, la complexité du métabolisme NADPH, nous a conduits à aborder le sujet par une approche de biologie des systèmes. Dans notre étude, cette approche a consisté à développer un modèle métabolique d'analyse de flux et à coupler cette analyse avec différentes données à l'échelle du génome, résultants d'analyses transcriptomiques, métabolomiques et fluxomiques.

Nous avons développé un modèle d'analyse de flux du réseau métabolique réduit au métabolisme carboné central (MCC) de *S. cerevisiae* dédié à la fermentation nommé *DynamoYeast*. Ce type d'approche repose sur la connaissance, parfois partielle, des enzymes actives, de leur localisation ou encore des contraintes thermodynamiques spécifiques aux conditions fermentaires. Les données sur la réversibilité et le rôle de certaines réactions décrites dans la littérature ont souvent été acquises en conditions standard de laboratoire (milieu riche ou synthétique contenant 2% de glucose, aérobiose), qui sont très différentes de nos conditions d'étude (anaérobiose, forte concentration en sucre), ceci d'autant plus dans un contexte de perturbation des cofacteurs redox. Ce constat nous a conduit à faire un certain nombre d'hypothèse (**chapitre I**), qui pour certaines, peuvent avoir de fortes répercussions sur le pouvoir de prédiction du modèle. De plus, nous avons choisi d'ajouter la mitochondrie au réseau métabolique. Cependant le choix des transporteurs (**chapitre I**) lors de la conception

du réseau métabolique s'est avéré délicat. En effet, alors que ce choix peut être déterminant pour la prédiction des flux, il existe aujourd'hui encore de fortes incertitudes sur le sens de fonctionnement et la contribution de certains des transporteurs mitochondriaux chez la levure (une centaine au total). Malgré ces incertitudes, la validation du modèle à partir de données de la littérature, mais surtout à partir des données que nous avons acquises, a montré que les hypothèses retenues lors de la construction du modèle *DynamoYeast*, étaient compatibles et consistantes avec les métabolites extracellulaires tout au long d'une fermentation (**chapitre I**).

La deuxième étape a consisté à perturber *in vivo* de façon contrôlée et modulable le métabolisme NADPH par surexpression de l'enzyme BDH modifiée NADPH-dépendante, couplée à l'ajout d'acétoïne. A partir de la quantité résiduelle d'acétoïne et de la quantité de 2,3-butanediol produit, nous avons pu quantifier la quantité de NADPH consommée (**chapitre II**). Ce système s'est avéré efficace et très flexible, puisqu'il a permis d'augmenter la demande en NADPH de 8 à 40 fois, par rapport à la demande anabolique.

L'analyse de la réponse physiologique de la levure (croissance, capacités fermentaires) a révélé un comportement extrêmement robuste de la levure à ces perturbations, même à des niveaux très importants (**chapitre II**). Des différences métaboliques ont été observées en fonction de l'intensité de la perturbation, en particulier au niveau du glycérol. Pour une demande modérée de NADPH (8 et 13 fois la demande anabolique), la production de glycérol n'est pas modifiée, alors qu'elle est diminuée lors d'une forte perturbation de NADPH (22 fois la demande anabolique). Le glycérol étant un marqueur du métabolisme NADH - du fait de son rôle clé en fermentation pour réoxyder le surplus de NADH généré lors de l'anabolisme - il était attendu de voir ce métabolite varier en réponse à une perturbation du métabolisme NADH (ce que nous avons effectivement observé), mais pas lors de modifications du métabolisme NADPH. Nous avons donc émis l'hypothèse que le métabolisme du NADH pouvait être affecté lors de fortes perturbations du métabolisme NADPH (**chapitre II**).

Afin d'identifier les remaniements des flux intracellulaires au niveau du MCC, en réponse à ces perturbations, nous avons utilisé une approche MFA améliorée basée sur le principe de la conservation de la masse. A partir du modèle *DynamoYeast* et de l'intégration de données expérimentales de métabolites extracellulaires et de biomasse, nous avons déterminé que pour un besoin en NADPH qui correspond à 8 à 22 fois la demande anabolique, les flux à travers la VPP et la voie acétate (Ald6p) augmentent pour couvrir l'ensemble des besoins en contribuant, respectivement à 80 et 20 % de la demande (**chapitre II**). Expérimentalement, nous avons confirmé par une analyse de ^{13}C flux que le flux à travers la VPP augmente d'un

facteur 1,6, 2,4 et 2,9 (**chapitre III**) pour satisfaire la demande de NADPH représentant, respectivement, 8, 13 et 22 fois la demande anabolique. L'observation au chapitre III d'une surexpression d'une dizaine de gènes codant des oxydoréductases (tels que *ADH7* et *ARI*) suggère que d'autres voies pourraient contribuer, de façon mineure, à la formation de NADPH (**Chapitre III**).

Le couplage de ces approches à des analyses globales de métabolites intracellulaires et d'expression nous a permis d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes impliqués dans l'augmentation des flux à travers les voies acétate et VPP. Les études menées au **chapitre III** montrent que la voie acétate (Ald6p) est régulée de façon allostérique, alors que des stratégies de régulation différentes sont utilisées selon le niveau de demande en NADPH (**Chapitre III**). Pour une demande modérée de NADPH (8 fois la demande anabolique) la VPP est principalement contrôlée de façon allostérique. Par contre à partir de 13 fois la demande anabolique, un contrôle génétique faisant intervenir 4 gènes de cette voie est mis en place graduellement (**Chapitre III**).

Il est établi depuis longtemps que la VPP est fortement régulée au niveau allostérique (Vaseghi, et al., 1999). Néanmoins, en conditions de stress oxydatif, un contrôle transcriptionnel coordonné de cette voie par le facteur de transcription Stb5p a été observé. Stb5 active non seulement l'ensemble des gènes de la VPP, mais également de nombreux autres gènes impliqués dans la production du NADPH (Laroche et al., 2006). Nous nous sommes donc posé la question du rôle de Stb5 dans un contexte plus général de demande en NADPH, et, de manière sous-jacente, du possible rôle du ratio NADPH/NADP⁺ dans la signalisation de la réponse Stb5p-dépendante en conditions de stress oxydatif. L'analyse conduite au **Chapitre III** a révélé que les cibles de Stb5p ne sont pas régulées, à l'exception de quelques gènes de la VPP, ce qui montre clairement que Stb5p n'est pas impliqué dans la réorientation métabolique vers la production de NADPH dans nos conditions. D'autre part Stb5p est actif en absence de stress oxydatif (Cadière et al., 2011). Ces données permettent d'émettre l'hypothèse qu'en conditions de stress oxydatif Stb5p ne répond pas à un signal NADPH. Pour confirmer cela, il pourrait être intéressant de mesurer l'expression de gènes cibles de Stb5p (par exemple *ZWF1*, en utilisant un système gène rapporteur de type LacZ) dans la souche Bdh-NADPH en présence de différentes quantités d'acétoïne. D'autre part, *STB5* étant lui-même surexprimé en réponse au stress oxydatif, l'effet d'une oxydation du NADPH sur sa régulation pourrait également être étudié.

Nos travaux ont également mis en évidence des remaniements beaucoup plus larges du réseau métabolique en réponse à une forte demande en NADPH. Lors d'une forte perturbation supérieure à 22 fois la demande anabolique, la levure développe une nouvelle stratégie pour produire la totalité du NADPH demandé. L'analyse des contraintes redox par le modèle *DynamoYeast* a montré une diminution de la contribution de la VPP et une augmentation de la quantité de NADH réoxydé (**chapitre II**), mettant en évidence une conversion du NADH en NADPH. Une solution prédite par le modèle est l'activation du cycle glycérol-DHA, qui permet l'échange du NADH en NADPH (**Chapitre II**). Nos données expérimentales vont également dans le sens de cette hypothèse. En effet, nous avons observé une accumulation des intermédiaires de la VPP qui suggère une saturation de cette voie (**Chapitre III**), et une réduction du pool d'ATP (**Chapitre III**), qui est cohérente avec le coût énergétique lié au fonctionnement du cycle glycérol-DHAP. Nous avons aussi montré que l'augmentation de ce coût énergétique a des conséquences sur le flux glycolytique : le flux glycolytique est augmenté, (ii) l'activité de la la phosphofructokinase semble inhibée, conduisant à une modification des pools métaboliques du haut de la glycolyse (**Chapitre III**).

A ce niveau, on peut souligner l'importance mais aussi la difficulté de prise en compte des problèmes d'énergie dans les démarches de modélisation, les besoins énergétiques restant aujourd'hui impossible à prédire. Néanmoins, dans nos conditions de fermentation anaérobie, il est possible d'estimer le flux de consommation d'ATP à partir du flux de sa production, qui est fortement corrélée à la production d'éthanol. Nous avons montré que le flux de consommation de l'ATP de la souche Bdh-NADPH varie de 2 à 15 mmol/gDW/h au cours de la fermentation (la variation étant principalement due à l'accumulation de l'éthanol dans le milieu et à ses effets sur la perméabilité de la membrane aux protons dans des conditions de faible pH). Cette consommation est significativement augmentée en présence d'une forte perturbation. Ce dernier point a été déterminant dans la mise en évidence de l'activation d'un cycle futile (**Chapitre II**). Ce cycle pourrait donc jouer un rôle de valve redox en réponse à une perturbation NADPH, et pourrait fournir jusqu'à 40 fois la demande anabolique. Aucune régulation génétique des gènes de ce cycle n'a été par ailleurs mise en évidence (**Chapitre III**).

Enfin, nous avons également mis en évidence des effets secondaires de la perturbation NADPH sur le métabolisme des acides aminés (voie de synthèse des acides aminés soufrés, de la lysine et de la sérine). Il est probable que la moindre disponibilité en NADPH conduise la levure à limiter le flux de production de ces voies essentielles pour la croissance.

En réponse à ces perturbations de flux, des mécanismes locaux de régulation de ces voies compensent alors cette baisse de flux, à travers l'induction des enzymes de ces voies.

En conclusion, même si nous avons observé une adaptation transcriptomique du réseau métabolique face aux très fortes demande de NADPH, celle-ci semble relativement limitée au regard du niveau de la perturbation que nous avons obtenue. Cela conduit à conclure que le réseau métabolique de la levure semble disposer d'une capacité de production instantanée de NADPH qui couvre aux alentours de 10 fois la demande anabolique. Le fait qu'une telle réserve soit instantanément mobilisable conduit à s'interroger sur l'ordre de grandeur du flux de NADPH qui doit être mobilisé pour faire face à l'apparition d'un stress oxydatif.

Nous pouvons à travers les tests que nous avons réalisé sur la souche Bdh-NADPH en présence de stress oxydatif (3 mM H_2O_2) obtenir une réponse à cette question : une perturbation de l'ordre de 8 fois la demande anabolique (100 mM d'acétoïne) est létale pour la souche Bdh-NADPH (**Chapitre II**), alors qu'en absence de stress, la levure est capable de s'adapter à une demande en NADPH représentant 40 fois la demande anabolique (400 mM d'acétoïne). Cela suggère que la quantité de NADPH requis lors du stress oxydatif imposé représente au moins 30 fois la demande anabolique. Par conséquent, la levure, pour faire face à l'apparition soudaine d'un stress oxydatif, doit disposer "instantanément" d'une grande réserve de NADPH disponible qui dépasse très largement le NADPH fourni pour former la biomasse. Au regard du temps requis pour produire des enzymes en quantité nécessaire, on comprend la part importante de la régulation enzymatique dans la protection contre le stress oxydatif.

A plus long terme, ce travail pourrait être poursuivi dans plusieurs directions :

- En premier lieu nous pourrions valider biologiquement certaines conclusions obtenues par l'exploitation du modèle *DynamoYeast*, comme le rôle du cycle glycérol-DHA. L'inactivation totale de ce cycle n'est cependant pas simple, la réaction catalysée par la glycérol déshydrogénase étant codée par au moins 5 gènes, dont 4 seulement ont été identifiés. En effet, le quadruple mutant possède une activité résiduelle (Izawa et al., 2004). L'interruption de ce cycle au niveau de la dihydroxyacetone kinase, codée par les gènes *DAK1* et *DAK2* pourrait par ailleurs provoquer une accumulation du DHA, composé toxique pour la cellule. Un autre aspect à explorer est lié à la mise en évidence d'un excès de production de glycérol dans la souche 59A lors de l'analyse des contraintes redox (**Chapitre II**). Cette observation nous a conduits à proposer l'existence de réactions couplées aboutissant

à une production de NADH et à une consommation de NADPH dans le compartiment cytosolique. Après avoir testé un certain nombre d'hypothèses et au regard des connaissances actuelles, nous avons proposé le fonctionnement d'un cycle acétaldéhyde-glutamate, couplant la navette acétaldéhyde-éthanol aux isoformes glutamates déshydrogénases Gdh1p et Gdh2p. Cette hypothèse n'a pas pu être confirmée expérimentalement, la délétion de *GDH2* n'affectant pas la production de glycérol. Il n'en demeure pas moins que ce surplus implique l'existence de tels cycles, qui pourraient impliquer des déshydrogénases non encore identifiées, ou dont la localisation et/ou la spécificité de cofacteur n'a été pas correctement déterminée. Pour aller plus loin dans l'analyse du métabolisme redox, il faudrait développer des modèles plus complexes basées sur la stœchiométrie des réactions couplée à des données cinétiques. Par exemple, des informations sur les concentrations intracellulaires en cofacteurs, si possible dans différents compartiments, pourraient s'avérer très utiles. La mesure très précise des concentrations en cofacteurs, en particulier dans les différents compartiments, reste une tâche délicate. A ce titre, le développement récent de sondes fluorescentes basées sur la Green fluorescent protein permettant de mesurer le potentiel redox dans les compartiments cellulaires (Ayer et al., 2010) ouvre des perspectives intéressantes.

- Par ailleurs, notre modèle devra être complété au fil des avancées. L'existence de transporteurs de NADPH entre la mitochondrie et le cytosol n'a pas été démontrée en fermentation. En conséquence, la balance $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ doit être équilibrée indépendamment dans chaque compartiment. Cependant, récemment le rôle d'un transporteur, Yhm2p dans l'échange du NADPH entre les deux compartiments a été mis en évidence en condition de stress oxydatif (Castegna et al., 2010). L'étude de l'effet de la délétion de ce gène en réponse à une perturbation du NADPH nous permettrait de préciser le rôle de ce transporteur en fermentation.
- Lors de ces travaux de thèse, nous nous sommes focalisés sur la perturbation du NADPH cytosolique. Le système BDH-NADPH pourrait être utilisé pour perturber le NADPH mitochondrial, en délocalisant l'enzyme mutée. Cela pourrait permettre de préciser la contribution de *MAEI* et *IDPI* dans le maintien de l'homéostasie du NADPH mitochondrial.
- La disponibilité d'un premier modèle représentatif des conditions fermentaires ouvre également des perspectives pour la compréhension et le contrôle du fonctionnement du métabolisme. Il serait très intéressant d'étendre ce modèle au métabolisme azoté et au métabolisme secondaire, notamment en prenant en compte les voies de formation des arômes (esters, alcools supérieurs) qui, bien que représentant des flux mineurs, ont une grande

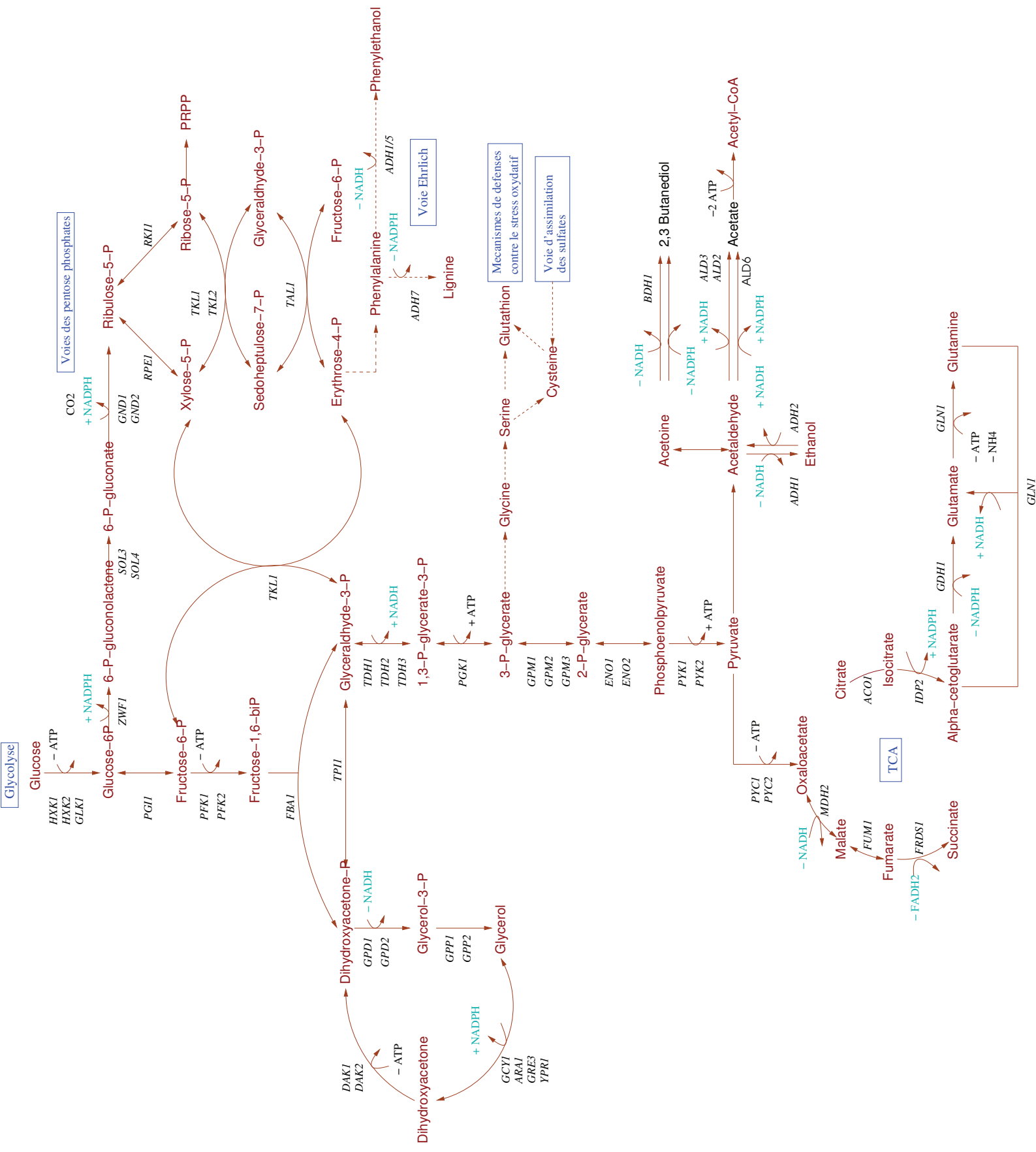
importance en fermentation œnologique. D'autre part, le modèle *DynamoYeast*, bien que réduit, peut avoir un intérêt prédictif pour le développement d'approches d'ingénierie métabolique. Il présente en effet des avantages particuliers liés à la possibilité d'une analyse précise des contraintes redox.

Finalement et sans doute à plus court terme, la disponibilité de ce modèle ouvre des perspectives intéressantes pour l'étude et l'analyse de la diversité métabolique chez la levure. Une étude récente d'analyse comparative du profil métabolique de 70 souches *S. cerevisiae* d'origines diverses a révélé une grande variabilité de certains traits métaboliques en conditions œnologiques, dont la production de glycérol (Camarasa et al., 2011). La démarche utilisée dans cette thèse et le modèle *DynamoYeast* pourraient être utilisés pour comparer les stratégies de maintien de l'équilibre redox de ces différentes souches. Des approches comme la maximisation du flux de production de l'éthanol pourraient en outre permettre d'apporter de nouveaux éclairages sur les stratégies évolutives de l'espèce *S. cerevisiae*.

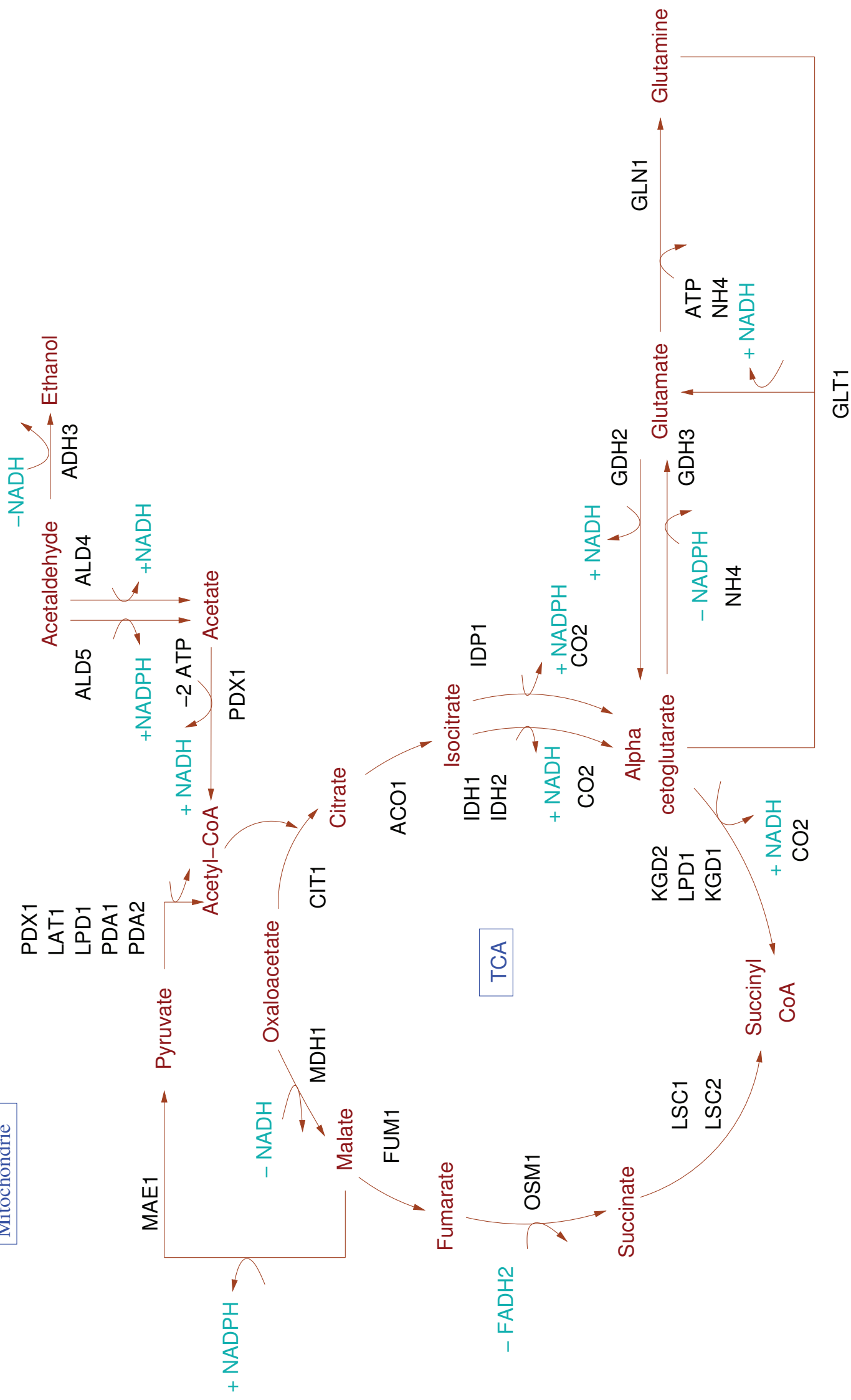
ANNEXES

Annexe 1 Métabolisme carboné central de *S. cerevisiae* en conditions de fermentation

Annexe 2 Métabolisme carboné central de la mitochondrie en conditions de fermentation



Mitochondrie



REFERENCES

- Albers E, Laizé V, Blomberg A, Hohmann S, Gustafsson L: **Ser3p (Yer081wp) and Ser33p (Yil074cp) are phosphoglycerate dehydrogenases in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Journal of Biological Chemistry* 2003, **278**(12):10264.
- Albertyn J, Hohmann S, Thevelein JM, Prior BA: **GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway.** *Molecular and cellular biology* 1994, **14**(6):4135.
- Ansell R, Granath K, Hohmann S, Thevelein JM, Adler L: **The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by GPD1 and GPD2 have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation.** *The EMBO journal* 1997, **16**(9):2179-2187.
- Aon MA, Roussel MR, Cortassa S, O'Rourke B, Murray DB, Beckmann M, Lloyd D: **The scale-free dynamics of eukaryotic cells.** *PloS one* 2008, **3**(11):e3624.
- Asano T, Kurose N, Hiraoka N, Kawakita S: **Effect of NAD⁺-dependent isocitrate dehydrogenase gene (IDH1, IDH2) disruption of sake yeast on organic acid composition in sake mash.** *Journal of bioscience and bioengineering* 1999, **88**(3):258-263.
- Ayer A, Tan SX, Grant CM, Meyer AJ, Dawes IW, Perrone GG: **The critical role of glutathione in maintenance of the mitochondrial genome.** *Free Radical Biology and Medicine* 2010.
- Bakker BM, Bro C, Kotter P, Luttik MAH, Van Dijken JP, Pronk JT: **The mitochondrial alcohol dehydrogenase Adh3p is involved in a redox shuttle in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Journal of bacteriology* 2000, **182**(17):4730.
- Bakker BM, Overkamp KM, van Maris AJ, Kotter P, Luttik MA, van Dijken JP, Pronk JT: **Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*.** *FEMS Microbiol Rev* 2001, **25**(1):15-37.
- Battogtokh D, Tyson JJ: **Bifurcation analysis of a model of the budding yeast cell cycle.** *Chaos: An Interdisciplinary Journal of Nonlinear Science* 2004, **14**:653.
- Beg QK, Vazquez A, Ernst J, De Menezes MA, Bar-Joseph Z, Barabási AL, Oltvai ZN: **Intracellular crowding defines the mode and sequence of substrate uptake by *Escherichia coli* and constrains its metabolic activity.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007, **104**(31):12663.
- Bieganowski P, Seidle HF, Wojcik M, Brenner C: **Synthetic lethal and biochemical analyses of NAD and NADH kinases in *Saccharomyces cerevisiae* establish separation of cellular functions.** *Journal of Biological Chemistry* 2006, **281**(32):22439.
- Bjorkqvist S, Ansell R, Adler L, Liden G: **Physiological response to anaerobicity of glycerol-3-phosphate dehydrogenase mutants of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Applied and environmental microbiology* 1997, **63**(1):128.
- Blank LM, Kuepfer L, Sauer U: **Large-scale 13C-flux analysis reveals mechanistic principles of metabolic network robustness to null mutations in yeast.** *Genome Biology* 2005, **6**(6):R49.
- Blomberg A, Adler L: **Physiology of osmotolerance in fungi.** *Adv Microb Physiol* 1992, **33**:145-212.
- Boles E, de Jong-Gubbels P, Pronk JT: **Identification and characterization of MAE1, the *Saccharomyces cerevisiae* structural gene encoding mitochondrial malic enzyme.** *Journal of bacteriology* 1998, **180**(11):2875.
- Boles E, Lehnert W, Zimmermann FK: **The role of the NAD dependent glutamate dehydrogenase in restoring growth on glucose of a *Saccharomyces cerevisiae* phosphoglucose isomerase mutant.** *European Journal of Biochemistry* 1993, **217**(1):469-477.
- Boy Marcotte E, Lagniel G, Perrot M, Bussereau F, Boudsocq A, Jacquet M, Labarre J: **The heat shock response in yeast: differential regulations and contributions of the Msn2p/Msn4p and Hsf1p regulons.** *Molecular microbiology* 1999, **33**(2):274-283.
- Boyd SP, Vandenberghe L: **Convex optimization:** Cambridge Univ Pr; 2004.
- Brewster NK, Val DL, Walker ME, Wallace JC: **Regulation of pyruvate carboxylase isozyme (PYC1, PYC2) gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentative and nonfermentative growth.** *Archives of biochemistry and biophysics* 1994, **311**(1):62-71.
- Bro C, Regenberg B, Forster J, Nielsen J: **In silico aided metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved bioethanol production.** *Metabolic engineering* 2006, **8**(2):102-111.
- Bruinenberg PM, Van Dijken JP, Scheffers WA: **A theoretical analysis of NADPH production and consumption in yeasts.** *Journal of General Microbiology* 1983, **129**(4):953.
- Cadenas E: **Thiol Redox Transitions in Cell Signaling: Chemistry and Biochemistry of Low Molecular Weight and Protein Thiols:** Academic Press; 2010.
- Cadière A, Galeote V, Dequin S: **The *Saccharomyces cerevisiae* zinc factor protein Stb5p is required as a basal regulator of the pentose phosphate pathway.** *FEMS yeast research* 2010.
- Cadière A, Ortiz-Julien A, Camarasa C, Dequin S: **Evolutionary engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains with increased in vivo flux through the pentose phosphate pathway.** *Metabolic*

Engineering 2011.

- Cakir T, Arga KY, Altintas MM, Ulgen KO: **Flux analysis of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* YPB-G utilizing starch for optimal ethanol production.** *Process Biochemistry* 2004, **39**(12):2097-2108.
- Camarasa C, Faucet V, Dequin S: **Role in anaerobiosis of the isoenzymes for *Saccharomyces cerevisiae* fumarate reductase encoded by OSM1 and FRDS1.** *Yeast* 2007, **24**(5):391-401.
- Camarasa C, Grivet JP, Dequin S: **Investigation by ¹³C-NMR and tricarboxylic acid (TCA) deletion mutant analysis of pathways for succinate formation in *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic fermentation.** *Microbiology* 2003, **149**(9):2669.
- Cambon B, Monteil V, Remize F, Camarasa C, Dequin S: **Effects of GPD1 overexpression in *Saccharomyces cerevisiae* commercial wine yeast strains lacking ALD6 genes.** *Applied and environmental microbiology* 2006, **72**(7):4688.
- Carmel-Harel O, Storz G: **Roles of the glutathione-and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress.** *Annual Reviews in Microbiology* 2000, **54**(1):439-461.
- Chen KC, Calzone L, Csikasz-Nagy A, Cross FR, Novak B, Tyson JJ: **Integrative analysis of cell cycle control in budding yeast.** *Molecular Biology of the Cell* 2004, **15**(8):3841.
- Cherry JM, Ball C, Weng S, Juvik G, Schmidt R, Adler C, Dunn B, Dwight S, Riles L, Mortimer RK: **Genetic and physical maps of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Nature* 1997, **387**(6632 Suppl):67.
- Ciriacy M: **Genetics of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Molecular and General Genetics MGG* 1975, **138**(2):157-164.
- Conway EJ, O'Malley E: **The nature of the cation exchanges during yeast fermentation, with formation of 0⁺ 02n-H ion.** *Biochemical Journal* 1946, **40**(1):59.
- Covert MW, Schilling CH, Palsson B: **Regulation of gene expression in flux balance models of metabolism.** *Journal of theoretical biology* 2001, **213**(1):73-88.
- Cupp JR, McAlister-Henn L: **NAD (+)-dependent isocitrate dehydrogenase. Cloning, nucleotide sequence, and disruption of the IDH2 gene from *Saccharomyces cerevisiae*.** *Journal of Biological Chemistry* 1991, **266**(33):22199.
- Delgado ML, O'Connor JE, Azorín I, Renau-Piqueras J, Gil ML, Gozalbo D: **The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase polypeptides encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* TDH1, TDH2 and TDH3 genes are also cell wall proteins.** *Microbiology* 2001, **147**(2):411.
- DeLuna A, Avendaño A, Riego L, González A: **NADP-glutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Journal of Biological Chemistry* 2001, **276**(47):43775.
- Dickinson J, Kruckeberg A: **Carbohydrate Metabolism.** *Yeasts in Food and Beverages* 2006:215-242.
- Dobson P, Smallbone K, Jameson D, Simeonidis E, Lanthaler K, Pir P, Lu C, Swainston N, Dunn W, Fisher P: **Further developments towards a genome-scale metabolic model of yeast.** *BMC Systems Biology* 2010, **4**(1):145.
- Duarte NC, Herrgard MJ, Palsson BO: **Reconstruction and validation of *Saccharomyces cerevisiae* iND750, a fully compartmentalized genome-scale metabolic model.** *Genome Res* 2004, **14**(7):1298-1309.
- Eden A, Simchen G, Benvenisty N: **Two yeast homologs of ECA39, a target for c-Myc regulation, code for cytosolic and mitochondrial branched-chain amino acid aminotransferases.** *Journal of Biological Chemistry* 1996, **271**(34):20242.
- Edwards JS, Covert M, Palsson B: **Metabolic modelling of microbes: the flux balance approach.** *Environmental Microbiology* 2002, **4**(3):133-140.
- Ehsani M, Fernández MR, Biosca JA, Dequin S: **Reversal of coenzyme specificity of 2, 3-butanediol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae* and in vivo functional analysis.** *Biotechnology and bioengineering* 2009, **104**(2):381-389.
- Ehsani M, Fernandez MR, Biosca JA, Julien A, Dequin S: **Engineering of 2, 3-butanediol dehydrogenase to reduce acetoin formation by glycerol-overproducing, low-alcohol *Saccharomyces cerevisiae*.** *Applied and environmental microbiology* 2009, **75**(10):3196.
- Engel SR, Balakrishnan R, Binkley G, Christie KR, Costanzo MC, Dwight SS, Fisk DG, Hirschman JE, Hitz BC, Hong EL: ***Saccharomyces* Genome Database provides mutant phenotype data.** *Nucleic acids research* 2010, **38**(suppl 1):D433.
- Entian KD, Meurer B, Helmut K, Mann KH, Mecke D: **Studies on the regulation of enolases and compartmentation of cytosolic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1987, **923**(2):214-221.
- Eriksson P, André L, Ansell R, Blomberg A, Adler L: **Cloning and characterization of GPD2, a second gene encoding sn glycerol 3 phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in *Saccharomyces cerevisiae*, and its comparison with GPD1.** *Molecular microbiology* 1995, **17**(1):95-107.
- Famili I, Förster J, Nielsen J, Palsson BO: ***Saccharomyces cerevisiae* phenotypes can be predicted by using constraint-based analysis of a genome-scale reconstructed metabolic network.** *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences* 2003, **100**(23):13134.
- Famili I, Mahadevan R, Palsson BO: **k-Cone analysis: determining all candidate values for kinetic parameters on a network scale.** *Biophysical journal* 2005, **88**(3):1616-1625.
- Fiaux J, Çakar ZP, Sonderegger M, Wuthrich K, Szyperski T, Sauer U: **Metabolic-flux profiling of the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*.** *Eukaryotic Cell* 2003, **2**(1):170.
- Flikweert MT, Swaaf M, Dijken JP, Pronk JT: **Growth requirements of pyruvate decarboxylase negative *Saccharomyces cerevisiae*.** *FEMS microbiology letters* 1999, **174**(1):73-79.
- Frick O, Wittmann C: **Characterization of the metabolic shift between oxidative and fermentative growth in *Saccharomyces cerevisiae* by comparative ¹³C flux analysis.** *Microbial Cell Factories* 2005, **4**(1):30.
- Fuhrer T, Sauer U: **Different biochemical mechanisms ensure network-wide balancing of reducing equivalents in microbial metabolism.** *Journal of bacteriology* 2009, **191**(7):2112.
- Gancedo JM: **Yeast carbon catabolite repression.** *Microbiology and molecular biology reviews* 1998, **62**(2):334.
- Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, Botstein D, Brown PO: **Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes.** *Molecular biology of the cell* 2000, **11**(12):4241.
- Godon C, Lagniel G, Lee J, Buhler JM, Kieffer S, Perrot M, Boucherie H, Toledano MB, Labarre J: **The H₂O₂ stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Journal of Biological Chemistry* 1998, **273**(35):22480.
- Goelzer A, Bekkal Brikci F, Martin-Verstraete I, Noirot P, Bessieres P, Aymerich S, Fromion V: **Reconstruction and analysis of the genetic and metabolic regulatory networks of the central metabolism of *Bacillus subtilis*.** *BMC Syst Biol* 2008, **2**(1):20.
- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M *et al*: **Life with 6000 genes.** *Science* 1996, **274**(5287):546, 563-547.
- Goldstein AL, McCusker JH: **Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Yeast* 1999, **15**(14):1541-1553.
- Gombert AK, Moreira dos Santos M, Christensen B, Nielsen J: **Network identification and flux quantification in the central metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* under different conditions of glucose repression.** *Journal of bacteriology* 2001, **183**(4):1441.
- Gombert AK, Nielsen J: **Mathematical modelling of metabolism.** *Current Opinion in Biotechnology* 2000, **11**(2):180-186.
- González E, Fernández MR, Larroy C, Parés X, Biosca JA: **Characterization and functional role of *Saccharomyces cerevisiae* 2, 3-butanediol dehydrogenase.** *Chemico-Biological Interactions* 2001, **130**:425-434.
- Gorsich SW, Dien BS, Nichols NN, Slininger PJ, Liu ZL, Skory CD: **Tolerance to furfural-induced stress is associated with pentose phosphate pathway genes ZWF1, GND1, RPE1, and TKL1 in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Applied microbiology and biotechnology* 2006, **71**(3):339-349.
- Grabowska D, Chelstowska A: **The ALD6 Gene Product Is Indispensable for Providing NADPH in Yeast Cells Lacking Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Activity.** *J Biol Chem* 2003, **278**(16):13984-13988.
- Grant CM: **Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions.** *Molecular microbiology* 2001, **39**(3):533-541.
- Göldener U, Heck S, Fiedler T, Beinhauer J, Hegemann JH: **A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast.** *Nucleic acids research* 1996, **24**(13):2519.
- Gutscher M, Pauleau AL, Marty L, Brach T, Wabnitz GH, Samstag Y, Meyer AJ, Dick TP: **Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential.** *Nature Methods* 2008, **5**(6):553-560.
- Han W, Li H, Cai J, McMahon F, Segal B, Blackwell TS: **NADPH Oxidase Limits Lung Inflammation Through Redox Regulation Of NF-kappaB Transcriptional Activity.** *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2011, **183**(1 MeetingAbstracts):A1103.
- Harbison CT, Gordon DB, Lee TI, Rinaldi NJ, Macisaac KD, Danford TW, Hannett NM, Tagne JB, Reynolds DB, Yoo J: **Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome.** *Nature* 2004, **431**(7004):99.
- Haselbeck RJ, McAlister-Henn L: **Isolation, nucleotide sequence, and disruption of the *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding mitochondrial NADP (H)-specific isocitrate dehydrogenase.** *Journal of Biological Chemistry* 1991, **266**(4):2339.
- Hatefi Y, Galante YM: **Dehydrogenase and transhydrogenase properties of the soluble NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1977, **74**(3):846.
- Hazelwood LA, Daran JM, van Maris AJA, Pronk JT, Dickinson JR: **The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism.** *Applied and environmental microbiology* 2008, **74**(8):2259.
- Heer D, Heine D, Sauer U: **Resistance of *Saccharomyces cerevisiae* to high concentrations of furfural is**

- based on NADPH-dependent reduction by at least two oxireductases. *Applied and environmental microbiology* 2009, **75**(24):7631.
- Heux S, Cadieere A, Dequin S: **Glucose utilization of strains lacking PGI1 and expressing a transhydrogenase suggests differences in the pentose phosphate capacity among *Saccharomyces cerevisiae* strains.** *FEMS Yeast Res* 2008, **8**(2):217-224.
- Holyoak CD, Bracey D, Piper PW, Kuchler K, Coote PJ: **The *Saccharomyces cerevisiae* weak-acid-inducible ABC transporter Pdr12 transports fluorescein and preservative anions from the cytosol by an energy-dependent mechanism.** *Journal of bacteriology* 1999, **181**(15):4644.
- Hou J, Lages NF, Oldiges M, Vemuri GN: **Metabolic impact of redox cofactor perturbations in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Metabolic Engineering* 2009, **11**(4-5):253-261.
- Hou J, Scalcinati G, Oldiges M, Vemuri GN: **Metabolic impact of increased NADH availability in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Applied and environmental microbiology* 2010, **76**(3):851.
- Izawa S, Sato M, Yokoigawa K, Inoue Y: **Intracellular glycerol influences resistance to freeze stress in *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of a quadruple mutant in glycerol dehydrogenase genes and glycerol-enriched cells.** *Applied microbiology and biotechnology* 2004, **66**(1):108-114.
- Jagow G, Klingenberg M: **Pathways of hydrogen in mitochondria of *Saccharomyces carlsbergensis*.** *European Journal of Biochemistry* 1970, **12**(3):583-592.
- Jamieson DJ: **Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *Yeast* 1998, **14**(16):1511-1527.
- Jeffries TW: **Engineering yeasts for xylose metabolism.** *Current Opinion in Biotechnology* 2006, **17**(3):320-326.
- Jeun YS, Kim MD, Park YC, Lee TH, Yoo MS, Ryu YW, Seo JH: **Expression of *Azotobacter vinelandii* soluble transhydrogenase perturbs xylose reductase-mediated conversion of xylose to xylitol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2003, **26**(3-6):251-256.
- Jia YK, Bécam AM, Herbert CJ: **The CIT3 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a second mitochondrial isoform of citrate synthase.** *Molecular microbiology* 1997, **24**(1):53-59.
- Juhnke H, Krems B, Kötter P, Entian KD: **Mutants that show increased sensitivity to hydrogen peroxide reveal an important role for the pentose phosphate pathway in protection of yeast against oxidative stress.** *Molecular and General Genetics MGG* 1996, **252**(4):456-464.
- Kato N, Sahm H, Schutte H, Wagner F: **Purification and properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase from a methanol-utilizing yeast, *Candida boidinii*.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology* 1979, **566**(1):1-11.
- Kauffman KJ, Prakash P, Edwards JS: **Advances in flux balance analysis.** *Current opinion in biotechnology* 2003, **14**(5):491-496.
- Kawai S, Suzuki S, Mori S, Murata K: **Molecular cloning and identification of UTR1 of a yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a gene encoding an NAD kinase.** *FEMS microbiology letters* 2001, **200**(2):181-184.
- Klipp E, Heinrich R, Holzhütter HG: **Prediction of temporal gene expression.** *European journal of biochemistry* 2002, **269**(22):5406-5413.
- Krüger A, Grüning NM, Wamelink MMC, Kerick M, Kirpy A, Parkhomchuk D, Bluemlein K, Schweiger MR, Soldatov A, Lehrach H: **The pentose phosphate pathway is a metabolic redox sensor and regulates transcription during the anti-oxidant response.** *Antioxidants & Redox Signaling* 2011(ja).
- Kuhn A, van Zyl C, van Tonder A, Prior BA: **Purification and partial characterization of an aldo-keto reductase from *Saccharomyces cerevisiae*.** *Applied and environmental microbiology* 1995, **61**(4):1580.
- Lagunas R, Gancedo JM: **Reduced pyridine-nucleotides balance in glucose-growing *Saccharomyces cerevisiae*.** *Eur J Biochem* 1973, **37**(1):90-94.
- Larochelle M, Drouin S, Robert F, Turcotte B: **Oxidative stress-activated zinc cluster protein Stb5 has dual activator/repressor functions required for pentose phosphate pathway regulation and NADPH production.** *Mol Cell Biol* 2006, **26**(17):6690-6701.
- Larsson C, Nilsson A, Blomberg A, Gustafsson L: **Glycolytic flux is conditionally correlated with ATP concentration in *Saccharomyces cerevisiae*: a chemostat study under carbon-or nitrogen-limiting conditions.** *Journal of bacteriology* 1997, **179**(23):7243.
- Leskovac V, Trivi S, Peri D: **The three zinc containing alcohol dehydrogenases from baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*.** *FEMS yeast research* 2002, **2**(4):481-494.
- Levy HR: **Glucose 6 Phosphate Dehydrogenases.** *Advances in enzymology and related areas of molecular biology* 1979:97-192.
- Liu H, Colavitti R, Rovira II, Finkel T: **Redox-dependent transcriptional regulation.** *Circulation research* 2005, **97**(10):967-974.

- Liu ZL, Moon J: **A novel NADPH-dependent aldehyde reductase gene from *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632 involved in the detoxification of aldehyde inhibitors derived from lignocellulosic biomass conversion.** *Gene* 2009, **446**(1):1-10.
- Llobell A, Lopez-Ruiz A, Peinado J, Lopez-Barea J: **Glutathione reductase directly mediates the stimulation of yeast glucose-6-phosphate dehydrogenase by GSSG.** *Biochemical Journal* 1988, **249**(1):293.
- Loftus TM, Hall LV, Anderson SL, McAlister-Henn L: **Isolation, characterization, and disruption of the yeast gene encoding cytosolic NADP-specific isocitrate dehydrogenase.** *Biochemistry* 1994, **33**(32):9661-9667.
- Lopes MB: **Fermentation properties of a wine yeast over expressing the *Saccharomyces cerevisiae* glycerol 3 phosphate dehydrogenase gene (GPD2).** *Australian Journal of Grape and Wine Research* 2000, **6**(3):208-215.
- Lorenz MC, Fink GR: **The glyoxylate cycle is required for fungal virulence.** *Nature* 2001, **412**(6842):83-86.
- Maaheimo H, Fiaux J, Cakar ZP, Bailey JE, Sauer U, Szyperski T: **Central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* explored by biosynthetic fractional ¹³C labeling of common amino acids.** *European Journal of Biochemistry* 2001, **268**(8):2464-2479.
- Malherbe S, Froment V, Hilgert N, Sablayrolles JM: **Modeling the effects of assimilable nitrogen and temperature on fermentation kinetics in enological conditions.** *Biotechnology and bioengineering* 2004, **86**(3):261-272.
- Matsufuji Y, Nakagawa T, Fujimura S, Tani A, Nakagawa J: **Transcription factor Stb5p is essential for acetaldehyde tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Journal of basic microbiology* 2010.
- Matsushika A, Inoue H, Kodaki T, Sawayama S: **Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives.** *Applied microbiology and biotechnology* 2009, **84**(1):37-53.
- Maurino VG, Gerrard Wheeler MC, Andreo CS, Drincovich MF: **Redundancy is sometimes seen only by the uncritical: Does *Arabidopsis* need six malic enzyme isoforms?** *Plant Science* 2009, **176**(6):715-721.
- Meaden PG, Dickinson FM, Mifsud A, Tessier W, Westwater J, Bussey H, Midgley M: **The ALD6 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a cytosolic, Mg²⁺ activated acetaldehyde dehydrogenase.** *Yeast* 1997, **13**(14):1319-1327.
- Michnick S, Roustan JL, Remize F, Barre P, Dequin S: **Modulation of Glycerol and Ethanol Yields During Alcoholic Fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* Strains Overexpressed or Disrupted for GPD1 Encoding Glycerol 3 Phosphate Dehydrogenase.** *Yeast* 1997, **13**(9):783-793.
- Minard KI, McAlister-Henn L: **Glucose-induced degradation of the MDH2 isozyme of malate dehydrogenase in yeast.** *Journal of Biological Chemistry* 1992, **267**(24):17458.
- Miyagi H, Kawai S, Murata K: **Two sources of mitochondrial NADPH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *Journal of Biological Chemistry* 2009, **284**(12):7553.
- Molin M, Norbeck J, Blomberg A: **Dihydroxyacetone Kinases in *Saccharomyces cerevisiae* Are Involved in Detoxification of Dihydroxyacetone.** *Journal of Biological Chemistry* 2003, **278**(3):1415.
- Moreira dos Santos M, Raghevedran V, Kotter P, Olsson L, Nielsen J: **Manipulation of malic enzyme in *Saccharomyces cerevisiae* for increasing NADPH production capacity aerobically in different cellular compartments.** *Metabolic engineering* 2004, **6**(4):352-363.
- Moreira dos Santos M, Thygesen G, Kötter P, Olsson L, Nielsen J: **Aerobic physiology of redox engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains modified in the ammonium assimilation for increased NADPH availability.** *FEMS yeast research* 2003, **4**(1):59-68.
- Nakamura CE, Whited GM: **Metabolic engineering for the microbial production of 1, 3-propanediol.** *Current Opinion in Biotechnology* 2003, **14**(5):454-459.
- Navarro Aviño JP, Prasad R, Miralles VJ, Benito RM, Serrano R: **A proposal for nomenclature of aldehyde dehydrogenases in *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of the stress inducible ALD2 and ALD3 genes.** *Yeast* 1999, **15**(10A):829-842.
- Nielsen J: **It is all about metabolic fluxes.** *Journal of bacteriology* 2003, **185**(24):7031.
- Nissen TL, Anderlund M, Nielsen J, Villadsen J, Kielland Brandt MC: **Expression of a cytoplasmic transhydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae* results in formation of 2 oxoglutarate due to depletion of the NADPH pool.** *Yeast* 2001, **18**(1):19-32.
- Nissen TL, Anderlund M, Nielsen J, Villadsen J, Kielland-Brandt MC: **Expression of a cytoplasmic transhydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae* results in formation of 2-oxoglutarate due to depletion of the NADPH pool.** *Yeast* 2000, **18**(1):19-32.
- Nogae I, Johnston M: **Isolation and characterization of the ZWF1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*, encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase.** *Gene* 1990, **96**(2):161-169.
- Nookaew I, Jewett MC, Meechai A, Thammarongtham C, Laoteng K, Cheevadhanarak S, Nielsen J, Bhumiratana S: **The genome-scale metabolic model iIN 800 of *Saccharomyces cerevisiae* and its validation: a scaffold to query lipid metabolism.** *BMC Systems Biology* 2008, **2**(1):71.

- Norbeck J, Blomberg A: **Metabolic and regulatory changes associated with growth of *Saccharomyces cerevisiae* in 1.4 M NaCl.** *Journal of Biological Chemistry* 1997, **272**(9):5544.
- Oechsner U, Magdolen V, Bandlow W: **A nuclear yeast gene (GCY) encodes a polypeptide with high homology to a vertebrate eye lens protein.** *FEBS letters* 1988, **238**(1):123-128.
- Outten CE, Culotta VC: **A novel NADH kinase is the mitochondrial source of NADPH in *Saccharomyces cerevisiae*.** *The EMBO journal* 2003, **22**(9):2015-2024.
- Påhlman AK, Granath K, Ansell R, Hohmann S, Adler L: **The yeast glycerol 3-phosphatases Gpp1p and Gpp2p are required for glycerol biosynthesis and differentially involved in the cellular responses to osmotic, anaerobic, and oxidative stress.** *Journal of Biological Chemistry* 2001, **276**(5):3555.
- Pang SS, Duggleby RG: **Expression, purification, characterization, and reconstitution of the large and small subunits of yeast acetoacetyl-CoA synthase.** *Biochemistry* 1999, **38**(16):5222-5231.
- Park H, Hwang YS: **Genome-wide transcriptional responses to sulfite in *Saccharomyces cerevisiae*.** *The Journal of Microbiology* 2008, **46**(5):542-548.
- Piper P, Calderon CO, Hatzixanthis K, Mollapour M: **Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives.** *Microbiology* 2001, **147**(10):2635.
- Pramanik J, Keasling JD: **Stoichiometric model of *Escherichia coli* metabolism: Incorporation of growth rate dependent biomass composition and mechanistic energy requirements.** *Biotechnology and bioengineering* 1997, **56**(4):398-421.
- Pronk JT, Steensma HY, Van Dijken JP: **Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Yeast* 1996, **12**(16):1607-1633.
- Przybyla-Zawislak B, Gadde DM, Ducharme K, McCammon MT: **Genetic and biochemical interactions involving tricarboxylic acid cycle (TCA) function using a collection of mutants defective in all TCA cycle genes.** *Genetics* 1999, **152**(1):153.
- Remize F, Andrieu E, Dequin S: **Engineering of the pyruvate dehydrogenase bypass in *Saccharomyces cerevisiae*: role of the cytosolic Mg²⁺ and mitochondrial K⁺ acetaldehyde dehydrogenases Ald6p and Ald4p in acetate formation during alcoholic fermentation.** *Applied and environmental microbiology* 2000, **66**(8):3151.
- Remize F, Cambon B, Barnavon L, Dequin S: **Glycerol formation during wine fermentation is mainly linked to Gpd1p and is only partially controlled by the HOG pathway.** *Yeast* 2003, **20**(15):1243-1253.
- Remize F, Roustan JL, Sablayrolles JM, Barre P, Dequin S: **Glycerol overproduction by engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains leads to substantial changes in by-product formation and to a stimulation of fermentation rate in stationary phase.** *Applied and environmental microbiology* 1999, **65**(1):143.
- Rodrigues Pousada C, Menezes RA, Pimentel C: **The Yap family and its role in stress response.** *Yeast* 2010, **27**(5):245-258.
- Romano P, Suzzi G: **Origin and production of acetoin during wine yeast fermentation.** *Applied and environmental microbiology* 1996, **62**(2):309.
- Runquist D, Hahn-Hägerdal B, Bettiga M: **Increased expression of the oxidative pentose phosphate pathway and gluconeogenesis in anaerobically growing xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*.** *Microbial cell factories* 2009, **8**(1):49.
- Saint-Prix F, Bönquist L, Dequin S: **Functional analysis of the ALD gene family of *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic growth on glucose: the NADP⁺-dependent Ald6p and Ald5p isoforms play a major role in acetate formation.** *Microbiology* 2004, **150**(7):2209.
- Sainz J, Pizarro F, Perez-Correa JR, Agosin E: **Modeling of yeast metabolism and process dynamics in batch fermentation.** *Biotechnol Bioeng* 2003, **81**(7):818-828.
- Samokhvalov V, Ignatov V, Kondrashova M: **Inhibition of Krebs cycle and activation of glyoxylate cycle in the course of chronological aging of *Saccharomyces cerevisiae*. Compensatory role of succinate oxidation.** *Biochimie* 2004, **86**(1):39-46.
- Sauer U: **Metabolic networks in motion: 13C-based flux analysis.** *Molecular Systems Biology* 2006, **2**(1).
- Schiestl RH, Gietz RD: **High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier.** *Current Genetics* 1989, **16**(5):339-346.
- Shi F, Kawai S, Mori S, Kono E, Murata K: **Identification of ATP NADH kinase isozymes and their contribution to supply of NADP (H) in *Saccharomyces cerevisiae*.** *FEBS Journal* 2005, **272**(13):3337-3349.
- Sinha A, Maitra PK: **Induction of specific enzymes of the oxidative pentose phosphate pathway by gluconolactone in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Journal of general microbiology* 1992, **138**(9):1865.
- Slekar KH, Kosman DJ, Culotta VC: **The yeast copper/zinc superoxide dismutase and the pentose phosphate pathway play overlapping roles in oxidative stress protection.** *Journal of Biological Chemistry* 1996, **271**(46):28831.
- Smyth GK, Yang YH, Speed T: **Statistical issues in cDNA microarray data analysis.** *METHODS IN*

- MOLECULAR BIOLOGY-CLIFTON THEN TOTOWA- 2003, **224**:111-136.
- Sprague GF, Cronan JE: **Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants defective in glycerol catabolism.** *Journal of Bacteriology* 1977, **129**(3):1335.
- Steffan JS, McAlister-Henn L: **Isolation and characterization of the yeast gene encoding the MDH3 isozyme of malate dehydrogenase.** *Journal of Biological Chemistry* 1992, **267**(34):24708.
- Stein WD: **Permeability for lipophilic molecules.** *New Comprehensive Biochemistry* 1981, **2**:1-28.
- Suissa M, Suda K, Schatz G: **Isolation of the nuclear yeast genes for citrate synthase and fifteen other mitochondrial proteins by a new screening method.** *The EMBO Journal* 1984, **3**(8):1773.
- Ter Linde JJM, Liang H, Davis RW, Steensma HY, Van Dijken JP, Pronk JT: **Genome-wide transcriptional analysis of aerobic and anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Journal of Bacteriology* 1999, **181**(24):7409.
- Thomas D, Cherest H, Surdin-Kerjan Y: **Identification of the structural gene for glucose-6-phosphate dehydrogenase in yeast. Inactivation leads to a nutritional requirement for organic sulfur.** *The EMBO Journal* 1991, **10**(3):547.
- Thorpe GW, Fong CS, Alic N, Higgins VJ, Dawes IW: **Cells have distinct mechanisms to maintain protection against different reactive oxygen species: oxidative-stress-response genes.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, **101**(17):6564.
- Todisco S, Agrimi G, Castegna A, Palmieri F: **Identification of the mitochondrial NAD⁺ transporter in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Journal of Biological Chemistry* 2006, **281**(3):1524.
- Vallino J, Stephanopoulos G: **Metabolic Flux Distributions in *Corynebacterium glutamicum* During Growth and Lysine Overproduction.** *Biotechnology and Bioengineering* 1993, **41**:633-646.
- van Dijken JP, Scheffers WA: **Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts.** *FEMS microbiology letters* 1986, **32**(3-4):199-224.
- van Winden W, Verheijen P, Heijnen S: **Possible pitfalls of flux calculations based on ¹³C-labeling.** *Metabolic Engineering* 2001, **3**(2):151-162.
- Vargas F, Pizarro F, Pérez-Correa JR, Agosin E: **Expanding a dynamic flux balance model of yeast fermentation to genome-scale.** *BMC systems biology* 2011, **5**(1):75.
- Vargas RC, Garcia-Salcedo R, Tenreiro S, Teixeira MC, Fernandes AR, Ramos J, Sa-Correia I: ***Saccharomyces cerevisiae* multidrug resistance transporter Qdr2 is implicated in potassium uptake, providing a physiological advantage to quinidine-stressed cells.** *Eukaryotic Cell* 2007, **6**(2):134.
- Vaseghi S, Baumeister A, Rizzi M, Reuss M: **In Vivo Dynamics of the Pentose Phosphate Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Metabolic Engineering* 1999, **1**(2):128-140.
- Vazquez A, Beg Q: **Impact of the solvent capacity constraint on *E. coli* metabolism.** *BMC systems biology* 2008, **2**(1):7.
- Vemuri GN, Eiteman MA, McEwen JE, Olsson L, Nielsen J: **Increasing NADH oxidation reduces overflow metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007, **104**(7):2402.
- Verduyn C, Postma E, Scheffers WA, van Dijken JP: **Physiology of *Saccharomyces Cerevisiae* in Anaerobic Glucose-Limited Chemostat Cultures.** *Journal of general microbiology* 1990, **136**(3):395.
- Verduyn C, Stouthamer AH, Scheffers WA, Dijken JP: **A theoretical evaluation of growth yields of yeasts.** *Antonie van Leeuwenhoek* 1991, **59**(1):49-63.
- Verduyn C, Zomerdijk TPL, Dijken JP, Scheffers WA: **Continuous measurement of ethanol production by aerobic yeast suspensions with an enzyme electrode.** *Applied microbiology and biotechnology* 1984, **19**(3):181-185.
- Verleur N, Elgersma Y, Roermund CWT, Tabak HF, Wanders RJA: **Cytosolic Aspartate Aminotransferase Encoded by the AAT2 Gene is Targeted to the Peroxisomes in Oleate Grown *Saccharomyces Cerevisiae*.** *European Journal of Biochemistry* 1997, **247**(3):972-980.
- Vido K, Spector D, Lagniel G, Lopez S, Toledano MB, Labarre J: **A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Journal of Biological Chemistry* 2001, **276**(11):8469.
- Weissbach H, Brot N: **Methionine Sulfoxide Reductases: A Protective System against Oxidative Damage.** *Glutathione and Sulfur Amino Acids in Human Health and Disease* 2009:157-187.
- White WH, Skatrud PL, Xue Z, Toyn JH: **Specialization of Function Among Aldehyde Dehydrogenases: The ALD2 and ALD3 Genes Are Required for β -Alanine Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Genetics* 2003, **163**(1):69.
- Wiechert W: **¹³C metabolic flux analysis.** *Metabolic engineering* 2001, **3**(3):195-206.
- Williamson DH, Lund P, Krebs HA: **The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver.** *Biochemical Journal* 1967, **103**(2):514.
- Winde JH, Crauwels M, Hohmann S, Thevelein JM, Winderickx J: **Differential Requirement of the Yeast Sugar Kinases for Sugar Sensing in Establishing the Catabolite Repressed State.** *European Journal of Biochemistry* 1996, **241**(2):633-643.

Zelle RM, Harrison JC, Pronk JT, van Maris AJA: **Anaplerotic Role for Cytosolic Malic Enzyme in Engineered *Saccharomyces cerevisiae* Strains.** *Applied and Environmental Microbiology* 2011, **77**(3):732.

Résumé

L'élucidation des propriétés du réseau métabolique est fondamentale pour la compréhension du fonctionnement cellulaire et pour l'élaboration de stratégies d'ingénierie métabolique. L'objectif de cette thèse était de mieux comprendre la régulation du métabolisme du NADPH, un métabolite "hub" qui joue un rôle central dans de nombreux processus cellulaires, chez *Saccharomyces cerevisiae* en fermentation. Nous avons utilisé une démarche systématique couplant modélisation et approches multi-"omics" pour étudier de façon quantitative la réponse à une perturbation de la demande en NADPH.

Un système expérimental original, basé sur l'expression d'une butanediol déshydrogénase modifiée NADPH-dépendante a été utilisé pour augmenter de façon contrôlée la demande en NADPH. L'utilisation de ce dispositif, le développement et l'utilisation d'un modèle stœchiométrique de la levure dédié à la fermentation ont permis de prédire la répartition des flux pour différents niveaux de perturbation. Ces analyses ont montré, en premier lieu, la très grande capacité de la levure à faire face à des demandes très importantes de NADPH représentant jusqu'à 40 fois la demande anabolique. Pour des demandes modérées (allant jusqu'à 20 fois la demande anabolique), la perturbation est principalement compensée par une augmentation du flux à travers la voie des pentoses phosphate (VPP) et à moindre titre à travers la voie acétate (Ald6p). Pour une forte demande en NADPH, correspondant à 40 fois la demande anabolique, le modèle prédit la saturation de la VPP ainsi que la mise en place du cycle glycérol-DHA, qui permet l'échange du NADH en NADPH. Des analyses fluxomique (^{13}C), métabolomique et transcriptomique, ont permis de valider ces hypothèses et de les compléter. Nous avons mis en évidence différents niveaux de régulation selon l'intensité de la perturbation : pour les demandes modérées, les flux sont réajustés par un contrôle au niveau enzymatique ; pour de fortes demandes, un contrôle transcriptionnel de plusieurs gènes de la VPP ainsi que de certains gènes des voies de biosynthèse des acides aminés est observé, cet effet résultant probablement de la moindre disponibilité en NADPH. Dans l'ensemble, ce travail a apporté un nouvel éclairage sur les mécanismes impliqués dans l'homéostasie du NADPH et plus généralement dans l'équilibre redox intracellulaire.

Mots-clés : homéostasie NADPH, analyse de flux, voie des pentoses phosphates, régulations génétiques and métaboliques, cycles redox.

Summary

The elucidation of the properties of metabolic network is essential to increase our understanding of cellular function and to design metabolic engineering strategies. The objective of this thesis was to better understand the regulation of the metabolism of NADPH, a "hub" metabolite which plays a central role in many cellular processes in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. We used a systematic approach combining modeling and multi-"omics" analyses to study quantitatively the response to a perturbation of the NADPH demand.

An original experimental system, based on the expression of a modified NADPH-dependent butanediol dehydrogenase was used to increase the demand for NADPH in a controlled manner. Through the use of this device and the development and use of a stoichiometric model of yeast dedicated to the fermentation, we predicted the flux distribution for different levels of perturbation. These experiments showed, first, the overwhelming ability of yeast to cope with very high NADPH demand, up to 40 times the anabolic demand. For a moderate level (up to 20 times the anabolic demand), the perturbation is mainly compensated by increased flux through the pentose phosphate pathway (PPP) and to a lesser extent through the acetate pathway (Ald6p). For a high NADPH demand, corresponding to 40 times the anabolic demand, the model predicts the saturation of the PPP as well as the operation of the glycerol-DHA cycle, which allows the exchange of NADH to NADPH. Fluxomics (^{13}C), metabolomics and transcriptomics data were used to validate and to complement these hypotheses. We showed different levels of control depending on the intensity of the perturbation: for moderate demands, flux remodeling is mainly achieved by enzymatic control; for a high demand, a transcriptional control is observed for several genes of the PPP as well as some genes of the amino acids biosynthetic pathways, this latter effect being likely due to the low NADPH availability. Overall, this work has shed new light on the mechanisms governing NADPH homeostasis and more generally the intracellular redox balance.

Keywords: NADPH homeostasis, flux analysis, pentose phosphate pathway, genetic and metabolic regulation, redox cycles.